



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

MÉLANIE MAZURIER

le jeudi 26 avril 2018

Titre :

BIODIVERSITÉ ET ADAPTATION AU PATHOGENE RACINAIRE VERTICILLIUM
ALFALFAE CHEZ MEDICAGO TRUNCATULA.
IMPORTANCE DE LA MICRO-ÉVOLUTION

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED SDU2E : Écologie fonctionnelle

Unité de recherche :

Ecolab (Laboratoire écologie fonctionnelle et environnement)

Directeur/trice(s) de Thèse :

M LAURENT GENTZBITTEL, INP-ENSAT, TOULOUSE

MME CÉCILE BEN, INP-ENSAT, TOULOUSE

Jury :

M ALAIN GHESQUIERE, IRD, MONTPELLIER, Rapporteur

MME BERNADETTE JULIER, INRA, LUSIGNAN, Rapportrice

MME MARIE-LAURE PILET-NAYEL, INRA, LE RHEU, Rapportrice

M CHRISTOPHE ROUX, UT3, TOULOUSE, Examineur, Président du jury

Remerciements

Ce n'est pas sans émotion que je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont soutenue de près ou de loin et dans la mesure de leur capacité dans ce projet.

Je tiens à remercier chaleureusement mes directeurs de thèse, Laurent Gentzbittel et Cécile Ben qui ont su me transmettre leur passion pour la génétique végétale dès mes études à l'ENSAT. Leur soutien et leur écoute sont les principaux ingrédients de l'aboutissement de ce projet. Je remercie Martina Rickauer pour sa contribution aux discussions et notamment son aide en microbiologie.

Je remercie Messieurs Christophe Roux et Alain Ghesquiere, Mesdames Bernadette Julier et Marie-Laure Pilet-Nayel qui ont accepté d'évaluer ces travaux.

Merci à Julia Buitink et Naceur Djebali pour les discussions et conseils apportés notamment durant les comités de thèse.

Je remercie l'INPT pour m'avoir attribué des fonds dans le cadre du soutien à la mobilité (SMI) pour un séjour de deux mois et demi dans le laboratoire de Sergey Nuzhdin à l'University of South California (USC). Je remercie Sergey Nuzhdin, les membres de son laboratoire et plus particulièrement Min-Gyoung Shin pour leur accueil.

Merci à l'Académie d'Agriculture de France pour m'avoir accordé une bourse Jean et Marie-Louise Dufrenoy-Crédit Agricole d'Ile-de-France mécénat afin de participer au XVIIème congrès MPMI (Molecular Plant-Microbe Interactions) à Portland, merci au laboratoire EcoLab pour avoir financé ma participation au 12th International Verticillium Symposium à Ljubljana.

Ce travail repose sur l'utilisation de nombreuses ressources végétales : merci à Jean-Marie Prosperi et à la GREEN USDA pour nous avoir fourni les graines des différentes accessions de *Medicago truncatula*. Merci à the Nobel foundation pour les mutants Tnt1. Merci à Eric Von Wettberg et Wendy Yu pour les graines des accessions tunisienne Soliman. Merci à Jens Stougaard et Terry Mun pour les accessions de lotier et les mutants LORE1. Merci au LRSV pour les graines d'*Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana* sp. Merci à l'Institut du Tabac de Bergerac pour les graines de *Nicotiana tabacum*.

Je remercie le laboratoire GBF et plus particulièrement Dominique Saint-Martin pour ses conseils ponctuels et Isabelle Mila pour les dépannages en divers consommables. Je remercie également David Roujol du LRSV pour m'avoir fourni le plasmide pH7WG2. Je remercie Genotoul et plus particulièrement les plateformes Genotoul-bioinfo (cluster de calculs) et Genotoul -GeT (Génome & Transcriptome) et plus particulièrement Sandra Fourré pour ses conseils.

Je remercie Noémie Taurines, Mallikarjuna Joga, Golnaz Mortezaei, Shaline Rana, Mylène Rigal, Marjorie Dénard, Kenza Chardronnet, Célia Chapelle, Laurent Fernando, Gabrielle Harel, Adrien Delpal, Cyril Aselmeyer, Jinata Dahal, Océane Sadonès, Thomas Romézy, Augustin Dunand-Alm, Gabrielle Petit et Cécile Lefèvre, étudiants stagiaires au sein de notre laboratoire de niveau 1ère année de BTS à Master 1 pour leur aide technique tout au long de cette thèse.

Je remercie les étudiants de l'ENSAT des promotions T11 à T16 ayant assisté aux enseignements Biotechnologies et Génétique pour l'amélioration et la protection des plantes pour leur enthousiasme et pour avoir testé dans le cadre de leurs travaux pratiques certains de mes protocoles.

Merci à Annick Corrège et Patricia Nouvet pour leur soutien dans les tâches administratives et au STIL pour leur soutien logistique.

Je remercie Yanis Amokrane, Eve-Anne Laurent, Abed Sbeiti, Maoulida Toueni, pour nos échanges aussi bien scientifiques que culturels. Abed Sbeiti (alias mon jumeau), ce fut un réel privilège et plaisir pour moi de travailler à tes côtés : ta bonne humeur caractérisée par ton sourire, tes « Oui, oui ... » et tes « T'inquiète, ça va marcher, c'est obligé » ont contribué à la poursuite de mes travaux lorsque rien ne fonctionnait.

Je remercie également mes camarades du club de tennis de table de Ramonville ; mes amis de la promotion ENSAT T10 (et plus particulièrement Anaïs Bellan, Julie Malécot et Annabelle Rablat) et mes voisines Josiane Clavié et Marie-France Fréchou pour leur soutien et leurs encouragements.

Pour finir, et en espérant n'oublier personne, merci à ma famille qui a toujours été présente pour moi même si ma passion pour mon sujet de recherche leur échappait parfois.

Merci à Matthieu pour son soutien inconditionnel.

Résumé

Les légumineuses font parties des familles les plus cultivées à la fois pour l'alimentation humaine et pour l'alimentation animale. Une des maladies principales de la luzerne (*Medicago sativa*), plante fourragère la plus cultivée au monde, est la verticilliose causée par *Verticillium alfalfae*, un champignon du sol. Sans traitements phytosanitaires efficaces et pratiques pour les maladies causées par des pathogènes du sol, la protection des cultures passe par la sélection de variétés résistantes. Dans cette thèse, la légumineuse modèle *Medicago truncatula* a été utilisée afin d'identifier des gènes candidats à la résistance quantitative à *Verticillium alfalfae* V31-2 (*Va* V31-2).

La première étape de ces travaux a révélé des sources de résistance à la souche *Va* V31-2 au sein de l'espèce *M. truncatula*. Pour cela, 261 lignées (dont 246 accessions issues du projet *MtHapMap*) ont été inoculées et le développement de flétrissements foliaires a été suivi pendant quatre semaines, suivi d'un réisolement du pathogène à partir des parties aériennes. Ces analyses ont révélé une grande biodiversité de réponse à la verticilliose au sein de l'espèce *Medicago truncatula*, avec une variabilité inter et intra-populations.

Dans une seconde partie, des QTL pour la résistance partielle à la verticilliose ont été identifiés par génétique d'association (GWAS) permettant la découverte de nouveaux QTL de résistance à *Va* V31-2 et la confirmation de la présence d'un QTL majeur sur le chromosome 7 précédemment décrit. Selon les phénotypes de maladie utilisés pour l'étude de GWAS, les QTL détectés sont différents, ce qui suggère des contrôles génétiques différents pour l'évolution des symptômes de maladie et la colonisation des parties aériennes par *Va* V31-2. Une seconde analyse de GWAS menée sur 90 accessions de la population tunisienne Soliman a révélé des gènes candidats différents de ceux identifiés à partir de la collection *MtHapmap*, suggérant une possible adaptation locale.

La validation fonctionnelle de gènes candidats pour la résistance partielle a été entamée, en privilégiant ceux situés sur le chromosome 7, à la convergence de différentes études génétiques. La mise en place d'un système d'inoculation *in vitro* de racines transgéniques a permis de révéler le rôle du gène *Medtr7g070480* codant pour une protéine SEC14 dans la résistance à *Va* V31-2. L'extinction de l'expression de ce gène par microARN artificiel dans le génotype A17 (résistant) et F83005.5 (sensible) diminue la colonisation des racines par *Va* V31-2, alors que sa surexpression augmente la colonisation chez A17 : il s'agirait donc d'un gène de sensibilité. L'unique polymorphisme génétique entraînant une substitution non synonyme entre A17 et F83005.5 explique 18,5% de la variation du niveau de résistance observée au sein des 246 accessions *MtHapmap*. L'étude de l'expression racinaire du gène *MtSEC14* 24 heures après inoculation par *Va* V31-2 dans un panel de 14 accessions sensibles et résistantes n'a pas montré de différences significatives entre ces deux types d'accessions.

En parallèle, des gènes orthologues aux gènes candidats à la résistance à *V. alfalfae* ont été identifiés chez d'autres plantes modèles (*Lotus japonicus*, *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana* sp.), puis la pathogénicité de *Va* V31-2 a été testée chez ces espèces en vue de leur éventuelle utilisation pour valider le rôle de ces gènes.

Un unique orthologue à *MtSEC14* a également été identifié chez *Medicago sativa*. Grâce à la synténie entre *M. truncatula* et *M. sativa*, nos travaux pourront très probablement être transférés à la luzerne cultivée.

A notre connaissance, ces travaux mettent en évidence pour la première fois le rôle d'un gène de sensibilité dans une résistance partielle à un micro-organisme chez les Légumineuses.

Mots clés : Maladies racinaires / Légumineuses / Verticilliose / Génétique d'association / Résistance quantitative / Validation fonctionnelle / Protéine SEC14 / Sensibilité

Abstract

Pathogens, animals and weeds are responsible for losses ranging from 20% to 40% of global agricultural yield. Legumes are the second most grown crops after cereals as human and animal food, and their yield is also affected by pathogens. *Verticillium alfalfae* is a soil-borne pathogen causing high yield losses in alfalfa fields (*Medicago sativa*), the most worldwide legume forage crop grown. To date, there is no chemical control and crop breeding is the best way to protect alfalfa against *V. alfalfae*. However, *Medicago sativa* has a complex genome (allopolyploid and tetraploid), therefore in this work the model legume *Medicago truncatula* (diploid and self-fertile) was used to investigate genetic mechanisms involved in *V. alfalfae* V31-2 (*Va* V31-2) resistance.

First, several sources of resistance were identified in *M. truncatula* biodiversity by assessing disease symptoms development in 261 lines from the Mediterranean basin inoculated by *V. alfalfae* V31-2. Reisolation of *V. alfalfae* V31-2 in *M. truncatula* stems was also led. These analyses revealed a great biodiversity of *M. truncatula* response towards *Va* V31-2.

A genome wide association study (GWAS) on various disease phenotypes pinpointed several quantitative trait loci (QTL): one of them colocalized with a previous major QTL on chromosome 7 detected on LR4 and LR5 RILs populations. Both phenotypic and genetic analyses thus suggest the occurrence of different resistance mechanisms in *M. truncatula* populations towards *V. alfalfae*. Resistant candidate genes towards *Va* V31-2 were also identified by GWAS using 90 accessions of *M. truncatula* Soliman Tunisian population. These candidate genes are different from the pinpointed candidate gene of our previous GWAS analysis. These results might underline a local adaptation towards *Verticillium*.

Consistencies between GWAS results with previous QTL and transcriptomic data led us to perform the functional validation with the candidate genes localized on chromosome 7. An original *in vitro* inoculation system of *M. truncatula* transgenic roots was used to validate Medtr7g070480 (gene encoding a SEC14 protein) as a key player towards *V. alfalfae* V31.2 in *M. truncatula*. Silencing the *SEC14* gene using artificial microRNA in A17 (resistant) and F83005.5 (susceptible) lines decreases *Va* V31-2 colonization rate on transgenic roots whereas overexpressing *MtSEC14* increases the colonization rate in A17. This *MtSEC14* gene appears as a disease susceptibility gene. Moreover, 18.5% of the disease variation in the studied *M. truncatula* accessions is explained by the unique non-synonymous polymorphism between A17 and F83005.5 in *MtSEC14*. Root expression patterns of the *SEC14* gene one day after inoculation by *Va* V31-2 was also analyzed in response to inoculation among a panel of 14 susceptible and resistant *M. truncatula* accessions of diverse geographic origins. No significant differences were found.

At the same time, orthologous resistance candidate genes towards *Va* V31.2 in several other model species (*Lotus japonicus*, *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana* sp.) were discovered. Pathogenicity of *Va* V31-2 in these species was monitored to use them as potential model for functional validation.

Only one orthologous gene of *MtSEC14* has been identified in *Medicago sativa*. Because of a great synteny between *M. truncatula* and *M. sativa*, our work could be useful for alfalfa breeding.

In this work and for the first time, a susceptibility gene involved in a quantitative resistance against microorganisms in Legumes was identified.

Keywords: Root disease / Legumes / Verticillium wilt / GWAS / Quantitative disease resistance / Functional validation / SEC14 protein / Susceptibility

Abréviations

ABA : acide absicique.

ADF : Actin Depolymerizing Factor.

ADH : alcool déshydrogénase.

ADN : Acide DésoxyriboNucléique.

ADNc : ADN complémentaire.

ADNg : ADN génomique.

ADP : Adénosine diphosphate.

amiR : microARN artificiel.

AMV : Alfalfa Mosaic Virus.

ANOVA : Analyse de variance.

ARN : Acide RiboNucléique.

ATAF : *Arabidopsis* transcription activation factor.

ATP : Adénosine triphosphate.

AUDPC : Area Under the Disease Progress Curve.

Avr : Avirulence protein.

BAC : Bacterial Artificial Chromosome.

BAK1 : brassinostéroïde intensive 1-associated kinase.

BIK1 : *Botrytis*-induced kinase 1.

bp : base pair (paire de bases).

BTI : Boyce Thompson Institute.

C-C : Coiled coil.

CIPAN : Culture intermédiaire piège à nitrates.

CP : Capping Protein.

CTAB : Cetyl TrimethylAmmonium Bromide (Bromure de cétrimonium).

CUC : cup-shaped cotyledon.

cv : cultivar.

DAMPs : Damage-Associated Molecular Patterns.

ddl : degré de liberté.

DEPC : DiEthyl PyroCarbonate.

DTI : DAMP -Triggered Imunity.

EC : Électro-Conductivité.

ECS : Endocytosis Cell Signaling domain.

EFR : Elongation Factor Tu Receptor.

EGF-RK : récepteurs kinases à domaine EGF (Epidermal Growth Factor).

ELRR : ELicitor Recognition Receptor.

eLRR-RPLs : Leucine-Rich Repeat of Receptor-like Proteins (protéines de type récepteur à domaine riche en leucine).

EMS : Ethyl MethaneSulfonate (Méthanesulfonate d'éthyle).

eQTL : QTL d'expression.

ERF : Ethylene Responsive Factor.

ERR : Effector Recognition Receptor.

ETI : Effector-Triggered Imunity.

ETS : Effector-Triggered Susceptibility.

FAO : Food and Agriculture Organisation.

FP6 : programme européen Sixth Framework Program.

G-BLUP : Genomic Best Linear Unbiased Prediction.

GEBVs : Genomic Estimated Breeding Values.

gène S : gène de Sensibilité.

GFP : Green Fluorescent Protein (protéine fluorescente verte).

GLM : General Linear Model (modèle linéaire généralisé).

GOLD : GOLgi Dynamics.

GS : Sélection Génomique.

GSP : Gène SPécifique.

GWAS : Genome Wide Association Study.

HIFs : Heterogeneous Inbred Families.

HR : Hypersensitive cell death Response.

ICARDI : International Center for Agricultural Research in the Dry Areas.

INRA : Institut National de Recherche Agronomique.

ITS : ribosomal Internal Transcribed Spacer.

JA : acide jasmonique.

LD : Linkage Disequilibrium (déséquilibre de liaison).

Lectin-RK : récepteurs kinases à domaine Lectine.

LORE1 : LOtus REtrotransposon 1.

LR : Réaction de Recombinaison.

LRR : Leucine Rich Repeats.

LRR-RKs : récepteurs kinases à domaine riche en leucine.

LRR-RP : récepteurs protéiques à domaine riche en leucine.

LysM : récepteurs à domaine à motif lysine.

MACE: Massive Analysis of cDNA Ends.

MAF : Minor Allele Frequency (fréquence de l'allèle mineur).

MAMPs : Microbe-Associated Molecular Patterns.

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase.

MARS : sélection récurrente assistée par marqueur.

MAS : sélection variétale assistée par marqueurs.

MATH : Meprin and Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAF-C) Homology.

miRs : microARNs.

MLM : Mixed Linear Model (modèle linéaire mixte).

MP : protéine de mouvement.

MSS : Maximum Symptoms Score.

MTI : MAMP-Triggered Immunity.

MVB : maturation du corps multi-vésiculaire.

NB-LRR : Nucleotide-Binding site and Leucine Rich Repeats.

NBS : Nucleotide-Binding Site.

NCGR : National Center for Genome Resources.

NES : Nuclear Exporting Signal.

NLS : Nuclear Localization Signal.

NSF : National Science Foundation.

PAL : Phenylalanine Ammonia-Lyase.

PAMPs : Pathogen Associated Molecular Patterns.

PCR : Polymerase Chain Reaction.

PEST : Protein degradation domain (proline-glycine-sérine-threonine).

PITPs : Phosphatidylinositol/phosphatidylcholine Transfer Proteins.

PPR : Pentatricopeptide Repeat proteins (protéines à domaine pentatricopeptide répété).

PR4 : Pathogenesis-Related protein 4.

PR5 : Pathogenesis-Related protein 5.

PRRs : Pattern Recognition Receptors.

PTI : PAMP-Triggered Immunity.

QDR : Résistance Quantitative à la Maladie.

qPCR : Polymerase Chain Reaction quantitative.

qRT-PCR : quantitative reverse transcription Polymerase Chain Reaction.

QTL : Quantitative Trait Loci.

RBOHD : Respiratory Burst Oxidase Homolog D.

RCBD : Randomized Complete Block Design.

RILs : Recombinant Inbred Lines.

RLKs : Receptor Like Kinase, récepteur de type kinase.

RNS : radicaux libres dérivés de l'azote (Reactive Nitrogen Species).

ROS : Reactive Oxygen Species (radicaux libres).

RR-BLUP : Ridge Regression Best Linear Unbiased Prediction.

RRMs : Resistance Related Metabolites.

RRPs : Resistance Related Proteins.

RRs : Resistance-Related.

SAR : résistance systémique acquise.

SARDI : South Australian Research and Development Institute.

SGS3 : Suppressor of Gene Silencing.

SNPs : Single Nucleotide Polymorphism.

SSR : Single Sequence Repeat.

START : STAR-related lipid Transfer domain.

TFs : facteurs de transcriptions.

TGN : Trans-Golgi Network.

TILLING : Targeting Induced Local Lesions IN Genomes.

TIR : Toll/Interleukin-1- receptors.

Tnt1 : Transposable element of *Nicotiana Tabacum* cell type 1.

TP : Training Population.

TrD : Transmembrane Domain.

USDA-ARS : United States Department of Agriculture - Agricultural Research Service.

VIGS : Virus-Induced Gene Silencing.

WAKs : kinases associées aux parois cellulaires.

Sommaire

Remerciements	i
Résumé	iii
Abstract	v
Abréviations	vii
Sommaire	xiii
Liste des figures	xxi
Liste des tableaux	xxxi
A. INTRODUCTION	1
I. Les maladies des plantes	3
1. Impacts agronomiques et écologiques des maladies des plantes	3
a. Conséquences agronomiques des maladies des plantes	3
b. Conséquences écologiques des maladies des plantes	7
2. Stratégies d'adaptation des plantes aux stress biotiques	15
3. Les pathogènes vasculaires	21
4. <i>Verticillium</i> sp. : l'agent causal de la verticilliose	25
a. Cycle de la maladie, transmission et dispersion	29
b. Moyens de lutte contre la verticilliose	33
II. Bases moléculaires de la résistance aux pathogènes chez les plantes	37
1. Défenses préformées et induites aux pathogènes	37
2. Perception des pathogènes et des toxines	41
3. Transduction du signal	47
4. Mécanismes de défense contre les pathogènes	51
III. Contrôle génétique de la résistance aux maladies chez les plantes, notamment contre la verticilliose	55
1. Résistance qualitative aux pathogènes	57

2.	Résistance quantitative aux maladies	59
a.	QDR par expression de gènes dépendant du stade phénologique de l'hôte.....	59
b.	QDR par haut niveau d'expression des gènes de résistance.....	63
c.	QDR résultant de kinases associées aux parois cellulaires (WAKs).....	71
d.	QDR résultant de formes altérées de gènes NB-LRR.....	73
e.	QDR basée sur les récepteurs PRRs.....	75
f.	QDR résultant d'une perte de fonction d'un allèle de sensibilité	77
g.	QDR résultant d'une modification du métabolisme de l'hôte	77
h.	Durabilité et sélection variétale de la QDR	79
3.	Mécanismes génétiques connus de résistances à la verticilliose.....	83
a.	Résistance qualitative.....	83
b.	Résistance quantitative	85
IV.	<i>Medicago truncatula</i> , plante modèle des légumineuses.....	93
1.	Importance nutritionnelle et écologique des légumineuses.....	93
2.	<i>Medicago sativa</i> et <i>Medicago truncatula</i> , plantes hôtes de <i>Verticillium sp.</i>	95
a.	<i>Medicago sativa</i> , une culture fourragère mondiale majeure	95
b.	<i>Medicago truncatula</i> et <i>Verticillium alfalfae</i> , un pathosystème modèle	101
3.	Les ressources génétiques et génomiques disponibles	105
a.	Génome de référence de la lignée A17	105
b.	Populations de RILs et cartes génétiques.....	107
c.	Collection de mutants	107
d.	Atlas de gènes exprimés.....	109
e.	Collections d'accessions naturelles	111
f.	Le projet MtHapmap	113
V.	Les études de génétique d'association	115
1.	Principe des études de génétique d'association	115
2.	Avantages et limites des études de génétique d'association	117
a.	Contrôle génétique des phénotypes étudiés	117

b.	Caractéristiques des individus utilisés pour le GWAS	121
c.	Analyse des résultats du GWAS.....	125
VI.	Objectifs de la thèse	129
1.	Etude de la biodiversité de la réponse à <i>Verticillium alfalfae</i> chez <i>Medicago truncatula</i> par la recherche de sources de résistance	129
2.	Identification de gènes candidats à la résistance à <i>Verticillium alfalfae</i> chez <i>Medicago truncatula</i>	131
3.	Mise en évidence du rôle de certains gènes candidats à la résistance à <i>Verticillium alfalfae</i> chez <i>Medicago truncatula</i> et chez <i>Lotus japonicus</i>	131
B.	MATERIEL ET METHODES	135
I.	Matériel biologique	137
1.	Matériel végétal	137
a.	<i>Medicago truncatula</i>	137
b.	Systèmes végétaux hétérologues.....	141
2.	Espèce Pathogène	145
3.	Souches bactériennes.....	145
II.	Observations des phénotypes de maladie	149
1.	Pathosystème <i>Medicago truncatula</i> / <i>Verticillium alfalfae</i>	149
a.	Inoculation par <i>Verticillium alfalfae</i> et notation des symptômes.....	149
b.	Réisolement de <i>Verticillium alfalfae</i> à partir de fragment de tiges de <i>Medicago truncatula</i>	151
2.	Autres modèles végétaux : <i>Lotus japonicus</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> et <i>Nicotiana benthamiana</i>	153
III.	Analyses statistiques et modélisation des données phénotypiques	155
1.	Calcul de paramètres de maladie permettant la prise en compte de la cinétique d'évolution de symptômes	155
a.	MSS.....	155
b.	AUDPC	155
c.	Modélisation.....	155

2.	Plans expérimentaux mis en place et modèles d'analyse statistique associés.....	157
a.	Plan en blocs augmentés.....	157
b.	Plan factoriel complet	157
c.	Analyse de variance.....	157
IV.	Analyses de génétique quantitative et bio-informatique	159
1.	Identification des gènes candidats à la résistance par génétique d'association	159
a.	Modèles statistiques	159
b.	Données génétiques.....	159
c.	Structure de population	161
d.	Matrices de Kinship	161
2.	Analyses de séquences et structure tertiaire protéique.....	161
V.	Biologie moléculaire.....	165
1.	Méthodes de biologie moléculaire générale.....	165
a.	Extraction d'ADN génomique.....	165
b.	Quantification de l'expression des gènes et des amiRs par qRT-PCR	167
c.	Réactions PCR et séquençage Sanger.....	173
2.	Clonage des microARNs artificiels (amiRs) et des gènes candidats	175
a.	Recherche des amiRs, choix des amorces et obtention des inserts.....	175
b.	Obtention et insertion des plasmides d'expression des amiRs et ADNc dans <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	179
3.	Quantification de <i>Verticillium</i> dans les tiges de <i>Medicago truncatula</i> par PCR quantitative. ..	189
4.	Génotypage de mutants d'insertion d'intérêt chez <i>Medicago truncatula</i> et <i>Lotus japonicus</i> .	191
VI.	Transformation des plantes par <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	193
1.	Cultures de plantes entières chimériques aux racines transgéniques.....	193
2.	Cultures de racines transgéniques	195
C.	RÉSULTATS.....	197

I.	Biodiversité de la réponse à la verticilliose aux niveaux de l'espèce et intra-population chez <i>Medicago truncatula</i>	199
1.	Analyse de la biodiversité de la réponse à Va V31-2 au sein de l'espèce <i>Medicago truncatula</i> par évaluation de la collection <i>MtHapMap</i>	199
a.	Evolution des symptômes de flétrissement foliaire	199
b.	Taux de réisolement de <i>Verticillium alfalfae</i> V31-2	205
2.	Analyse de la biodiversité de la réponse à Va V31-2 au sein de populations tunisiennes de <i>Medicago truncatula</i>	207
a.	TN1, TN7, TN8 et TN9 : des populations tunisiennes de <i>Medicago truncatula</i> très étudiées pour la réponse aux stress environnementaux.....	207
b.	Mise en évidence de variabilité de la réponse à Va V31-2 au sein de quatre populations du Nord de la Tunisie.....	211
c.	Analyse détaillée de la réponse à Va V31-2 au sein de la population Soliman (TN8).....	213
II.	Identification de gènes candidats à la résistance à la verticilliose par génétique d'association ..	215
1.	Analyse de génétique d'association de la collection <i>MtHapmap</i> et identification des gènes candidats	215
a.	Résultats de l'analyse de génétique d'association.....	215
b.	Analyse détaillée des QTLs majeurs détectés par GWAS pour l'identification de gènes candidats	217
c.	Autres gènes candidats à la résistance à <i>Verticillium alfalfae</i> chez <i>Medicago truncatula</i> identifiés par l'analyse de GWAS	223
d.	Validation génétique du QTL majeur situé sur le chromosome 7 par analyse de HIFs...	229
2.	Analyse de GWAS pour la résistance à la verticilliose au sein de la population tunisienne Soliman de <i>Medicago truncatula</i> et identification de gènes candidats.....	233
III.	Validation fonctionnelle des gènes candidats à la verticilliose chez <i>Medicago truncatula</i> par différentes approches	237
1.	Recherche de mutants de <i>Medicago truncatula</i> dans les gènes d'intérêt	237
2.	Validation fonctionnelle sur plantes entières aux racines transgéniques	239
a.	Obtention des vecteurs pour la transformation génétique racinaire	239

b.	Transformation génétique racinaire pour l'obtention de plantes chimériques et mise au point d'un système expérimental adapté pour le phénotypage en réponse à <i>Verticillium</i> ...	241
c.	Extinction de l'expression racinaire des candidats par amiR chez les accessions résistante A17 et sensible F83005.5	243
d.	Surexpression racinaire du gène candidat Medtr7g070480 codant pour une protéine SEC14 chez les accessions résistante A17 et sensible F83005.5	249
3.	Validation fonctionnelle sur racines transgéniques cultivées <i>in vitro</i> (hairy roots).....	253
a.	Mise au point du protocole expérimental.....	253
b.	Extinction et surexpression du gène candidat Medtr7g070480 dans des hairy roots chez l'accèsion résistante A17	257
c.	Extinction et surexpression du gène candidat Medtr7g070480 dans des hairy roots chez l'accèsion sensible F83005.5.....	261
4.	Etude du polymorphisme de séquence de la protéine SEC14 codé par le gène Medtr7g070480 au sein de la biodiversité naturelle de <i>Medicago truncatula</i>	265
5.	Etude de l'expression du gène candidat <i>SEC14</i> en réponse à l'inoculation par <i>Va</i> V31-2 dans un panel d'accèsions sensibles et résistantes	269
6.	Bilan des expériences de validation fonctionnelle	273
7.	Recherche d'orthologues de Medtr7g070480 chez la luzerne cultivée <i>Medicago sativa</i> ..	275
IV.	Vers la validation fonctionnelle de gènes candidats à la résistance à la verticilliose dans des pathosystèmes hétérologues	279
1.	Etude de la pathogénicité de <i>Verticillium alfalfae</i> V31-2 chez d'autres modèles végétaux.....	281
a.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	281
b.	<i>Nicotiana</i> sp.....	285
c.	<i>Lotus</i> sp.....	289
2.	Recherche de gènes orthologues aux gènes candidats à la résistance à <i>Verticillium alfalfae</i> V31-2 chez <i>Lotus japonicus</i>	291
3.	Caractérisation génétique des mutants <i>LORE1</i> dans le gène Lj1g3v2391210 de <i>Lotus japonicus</i> , orthologue du gène candidat Medtr7g070480 codant pour une protéine SEC14	293
V.	Contribution à d'autres travaux de recherche sur l'étude de la résistance à la verticilliose chez <i>Medicago truncatula</i>	297

1. Temperature increase as predicted by climate change modifies susceptibility to <i>Verticillium</i> wilt in <i>Medicago truncatula</i> and may lead to the appearance of new and more aggressive strains of the pathogen (soumis, Sbeiti, Mazurier <i>et al.</i>).....	297
a. Résumé des travaux	297
b. Contribution personnelle à ces travaux	299
2. Genome admixture components accurately predict quantitative functional traits in plants (soumis, Gentzbittel, Ben, Mazurier <i>et al.</i>)	301
a. Résumé des travaux	301
b. Contribution personnelle à ces travaux	303
D. DISCUSSION GÉNÉRALE	305
I. Biodiversité de la réponse de <i>Medicago truncatula</i> à <i>Verticillium alfalfae</i>	307
1. Identification de différentes sources de résistance à <i>Verticillium alfalfae</i> chez <i>Medicago truncatula</i> en fonction des phénotypes et paramètres de maladie	307
2. Une évaluation de la réponse à <i>Verticillium</i> à des stades de développement de <i>Medicago truncatula</i> plus tardifs pourraient révéler de nouvelles sources de résistance.....	313
3. Comparaison des résultats de génétique d'association obtenus au sein de la biodiversité de <i>Medicago truncatula</i> et de la population tunisienne Soliman.....	315
4. Complémentarité des approches QTL, GWAS, transcriptome et sélection génomique	319
II. Implication des protéines SEC14 dans le métabolisme des lipides.....	329
1. Identification du rôle des protéines SEC14 chez les plantes.....	329
a. Les protéines SEC14, des protéines de transfert de phospholipides	329
b. Les protéines SEC14 chez les végétaux	331
c. Rôle des protéines uniquement constituées du domaine SEC14	333
d. Protéines à domaine SEC14-GOLD	337
e. Protéines à domaines SEC14-noduline.....	337
f. Bilan sur le rôle de protéines SEC14 dans la réponse des plantes avec pathogènes.....	339
2. Rôle des lipides dans la résistance aux pathogènes.....	343
a. Rôle antimicrobien des acides gras	343
b. Rôle messager des acides gras	345

c.	Bilan du rôle des acides gras dans la résistance aux pathogènes	347
3.	Rôle des mouvements de vésicules dans les interactions plantes-pathogènes	349
a.	Mouvements vésiculaires chez les plantes en réponse aux pathogènes.....	349
b.	Rôle des vésicules dans la pathogénicité de <i>Verticillium</i>	355
III.	Identification d'un gène de sensibilité à <i>Verticillium alfalfae</i> chez <i>Medicago truncatula</i> ..	359
1.	Nature des gènes de sensibilité identifiés.....	359
a.	Gènes facilitant la reconnaissance de l'hôte et la pénétration du pathogène	359
b.	Gènes encodant des régulateurs négatifs des voies de signalisation de l'immunité végétale	363
c.	Gènes contribuant à la survie du pathogène post-pénétration.....	365
2.	Evolution et conséquences écologiques et agronomiques d'un gène de sensibilité.....	369
a.	Rôle pleiotropique des gènes de sensibilité.....	369
b.	Durabilité des résistances liées à l'altération de gènes de sensibilité	371
c.	Considérations concernant <i>MtSEC14</i> , facteur de sensibilité à la verticilliose chez <i>Medicago truncatula</i>	373
IV.	Applications des résultats obtenus aux espèces de légumineuses cultivées.....	377
E.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	383
I.	Quelles sont les caractéristiques fonctionnelles et la localisation intracellulaire de la protéine SEC14 ?	389
II.	Le gène <i>MtSEC14</i> confère-t-il une sensibilité à large spectre chez <i>Medicago truncatula</i> ? ...	393
III.	Le gène <i>MtSEC14</i> peut-il être une source de sensibilité chez <i>Medicago sativa</i> ?	395
IV.	La résistance à <i>Verticillium alfalfae</i> V31-2 chez <i>Medicago truncatula</i> est-elle le fruit d'une adaptation locale ?	397
V.	Qu'en est-il des autres gènes candidats à la résistance à <i>Verticillium alfalfae</i> V31-2 chez <i>Medicago truncatula</i> ?	399
VI.	Conclusion	401
F.	ANNEXES.....	403
G.	BIBLIOGRAPHIE.....	435

Liste des figures

Figure A-1 : Illustration du concept du triangle de la maladie.	2
Figure A-2 : Expansion du triangle de la maladie par des modifications chimiques et physiques de l'environnement (reproduit à partir de Chappelka and Grulke, 2016).	2
Figure A-3 : Pertes mondiales de rendement en fonction du type d'organisme et en fonction des méthodes de protection mises en place (adapté de Oerke, 2006).	4
Figure A-4 : Représentation schématique des interactions plantes-pathogènes et de leurs effets sur la coexistence des différentes espèces de plantes (extrait de Bever <i>et al.</i> , 2015).	10
Figure A-5 : Schéma de la réponse plastique aux changements environnementaux (reproduit à partir de Palacio-López <i>et al.</i> , 2015).	14
Figure A-6 : Modèles d'adaptation par micro-évolution (extrait de Flood and Hancock, 2017).	16
Figure A-7 : Structures de survie des principales espèces pathogènes de <i>Verticillium</i> (extrait de Inderbitzin <i>et al.</i> , 2011).	26
Figure A-8 : Relation phylogénétique entre les dix espèces de <i>Verticillium</i> (adapté de Inderbitzin and Subbarao, 2014).	26
Figure A-9 : Symptômes foliaires de <i>Verticillium</i> sp. sur différentes plantes hôtes (extrait de Fradin and Thomma, 2006).	28
Figure A-10 : Cycle de maladie de <i>Verticillium alfalfae</i> (adapté de Berlinger and Powelson, 2000; Inderbitzin <i>et al.</i> , 2011).	28
Figure A-11 : Colonisation racinaire de l'accession sensible F83005.5 de <i>Medicago truncatula</i> par une souche GFP de <i>Verticillium alfalfae</i> observée par microscopie confocale à balayage laser (extrait de Ben <i>et al.</i> , 2013a).	30
Figure A-12 : Illustration des différentes étapes où des agents de biocontrôle peuvent interférer dans le cycle de vie de <i>Verticillium</i> (extrait de Deketelaere <i>et al.</i> , 2017).	32
Figure A-13 : Schémas des barrières physiques à l'entrée des pathogènes chez la plante.	36
Figure A-14 : Modèle des interactions plante/pathogène en zigzag (extrait de Jones and Dangl, 2006).	38
Figure A-15 : Exemples de quelques structures de différents récepteurs immunitaires membranaires dont les ligands sont connus (extrait de Böhm <i>et al.</i> , 2014).	42

Figure A-16 : Exemples de classes majeures des différents récepteurs de reconnaissance des effecteurs (ERR) en fonction de leurs domaines fonctionnels (extrait de Gururani <i>et al.</i> , 2012).	42
Figure A-17 : Reconnaissance du MAMP flagelline par les récepteurs de motifs PRR chez <i>Arabidopsis thaliana</i> (adapté de Wang, 2012).	46
Figure A-18 : Reconnaissance des effecteurs par les protéines ERR de type NB-LRR conduisant à l'ETI (extrait de Cui <i>et al.</i> , 2015).	48
Figure A-19 : Rôles des principaux composés impliqués dans les interactions plante/pathogène (extrait de Kushalappa <i>et al.</i> , 2016).	50
Figure A-20 : Différences de phénotypes et de contrôles génétiques des résistances qualitatives et quantitatives (extrait de Corwin and Kliebenstein, 2017).	54
Figure A-21 : Exemples d'une analyse phylogénétique et structurelle des gènes <i>VE</i> et d'homologues à <i>VE</i> (extrait de Zhang <i>et al.</i> , 2012).	82
Figure A-22 : Co-expression transitoire d' <i>Ave1</i> et des gènes <i>Ve</i> chez <i>Nicotiana tabacum</i> (extrait de de Jonge <i>et al.</i> , 2012).	84
Figure A-23 : Exemple d'un modèle de la voie de signalisation induite par <i>Ve1</i> chez la tomate (extrait de Luo <i>et al.</i> , 2014).	84
Figure A-24 : Dendrogramme obtenu à partir des séquences protéiques prédites des homologues à <i>VE</i> chez <i>Solanum tuberosum</i> cv. Reddale (extrait de Simko <i>et al.</i> , 2004).	86
Figure A-25 : Localisation de QTLs contrôlant la résistance à <i>Verticillium longisporum</i> chez <i>Arabidopsis thaliana</i> (extrait de Häffner <i>et al.</i> , 2010).	86
Figure A-26 : Schéma global de la symbiose chez les légumineuses (adapté de Maroti and Kondorosi, 2014; Teng <i>et al.</i> , 2015).	92
Figure A-27 : Caractéristiques morphologiques des fleurs et ports de <i>Medicago sativa</i> subsp. <i>falcata</i> et <i>Medicago sativa</i> subsp. <i>sativa</i> (extrait de O'Rourke <i>et al.</i> , 2015).	94
Figure A-28 : Surfaces mondiales de luzerne cultivée par continent en 2009 (extrait de Yuego and Cash, 2009).	94
Figure A-29 : Exemples de symptômes de maladies, de ravageurs et de parasites de la luzerne.	98
Figure A-30 : Caractéristiques morphologiques des feuilles, fleurs, gousses et graines de <i>Medicago truncatula</i> .	100
Figure A-31 : Localisation de QTLs contrôlant la résistance à <i>Verticillium alfalfae</i> V31-2 chez <i>Medicago truncatula</i> (adapté de Ben <i>et al.</i> , 2013a).	100

Figure A-32 : Phases tardives de colonisation par <i>Verticillium alfalfae</i> V31-2 exprimant une GFP des racines de <i>Medicago truncatula</i> des accessions A17 (résistante) et F83005.5 (sensible) (extrait de Toueni <i>et al.</i> , 2016).	102
Figure A-33 : Représentation d'un des cinq modules de gènes co-exprimés dans les racines de la lignée résistante A17 lors de la réponse précoce (à 4, 8 et 24 heures après inoculation) à l'inoculation par <i>Verticillium alfalfae</i> V31-2 (extrait de Toueni <i>et al.</i> , 2016).....	104
Figure A-34 : Augmentation de l'ancrage des séquences sur le génome Mt4.0 de <i>Medicago truncatula</i> par rapport à la version Mt3.5 (extrait de Tang <i>et al.</i> , 2014).....	104
Figure A-35 : Populations de RILs existantes chez <i>Medicago truncatula</i> (extrait de Garmier <i>et al.</i> , 2017).	106
Figure A-36 : Répartition des accessions de <i>Medicago truncatula</i> dans les différents centres de ressources génétiques.....	110
Figure A-37 : Principe général de l'étude de génétique d'association (adapté de Rafalski, 2010).	114
Figure A-38 : Sources communes d'association entre phénotypes et allèles non-causaux dans les études de génétique d'association réalisées sans correction de structure de population, d'appariement entre individus et dans le cas d'un fort déséquilibre de liaison (extrait de Lipka <i>et al.</i> , 2015).	122
Figure A-39 : Amélioration des performances du GWAS en prenant en compte la structure et l'appariement entre individus (extrait de Korte and Farlow, 2013).	124
Figure B-1 : Mode d'obtention des mutants d'insertion <i>Tnt1</i>	138
Figure B-2 : Répartition géographique des 96 accessions de <i>Medicago truncatula</i> de la région de Soliman.....	140
Figure B-3: <i>Verticillium alfalfae</i> V31-2.....	144
Figure B-4 : Plantes de <i>Medicago truncatula</i> cultivées en pots Jiffy-7® inoculées par <i>Verticillium</i>	148
Figure B-5 : Echelle de développement des symptômes de la verticilliose chez <i>Medicago truncatula</i>	148
Figure B-6 : Tiges de <i>Medicago truncatula</i> à 5 jours après réisolement.....	150
Figure B-7 : Echelle de développement des symptômes de la verticilliose chez <i>Lotus japonicus</i>	152
Figure B-8 : Inoculations foliaires de <i>Nicotiana benthamiana</i> par <i>Verticillium alfalfae</i> V31-2.....	152
Figure B-9 : Illustration des phénotypes de maladie et des paramètres de modélisation pour une lignée.	154
Figure B-10 : Représentation schématique d'un plan en bloc augmenté.	156

Figure B-11: Principe de synthèse des amiRs.....	174
Figure B-12 : Illustration de la technologie de clonage GATEWAY™.....	178
Figure B-13 : Illustration des étapes du clonage : de l'insert à l'obtention du plasmide d'expression dans <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	178
Figure B-14 : Colonies isolées d' <i>E. coli</i> après transformation par choc thermique.....	180
Figure B-15 : Carte du plasmide pH7WG2 (adapté de Karimi <i>et al.</i> , 2002).....	184
Figure B-16 : Schéma explicatif du génotypage des mutants d'insertion de <i>Medicago truncatula</i> et <i>Lotus japonicus</i>	188
Figure B-17 : Illustration de la transformation racinaire de <i>Medicago truncatula</i> pour l'obtention des plantes chimériques et des racines transgéniques (ou hairy roots).	192
Figure C-1 : Histogrammes représentant le nombre de répétitions par accession (A) et le nombre de plantes par accession (B) dont la réponse à <i>Verticillium alfalfae</i> V31-2 a été étudiée.	198
Figure C-2 : Développement des symptômes de flétrissement chez un sous-ensemble de 64 accessions de <i>Medicago truncatula</i> inoculées par <i>Verticillium alfalfae</i> V31-2.....	200
Figure C-3 : Boîtes à moustache représentant l'AUDPC (A) et le MSS (B) moyen ajusté par répétition des 261 accessions de <i>Medicago truncatula</i> quatre semaines après inoculation par <i>Verticillium alfalfae</i> V31-2.	202
Figure C-4 : Colonisation des parties aériennes de 257 accessions de <i>Medicago truncatula</i> par <i>Verticillium alfalfae</i> V31-2 en fonction du MSS à quatre semaines après inoculation.....	204
Figure C-5 : Localisation géographique des populations tunisiennes et réponse à <i>Verticillium alfalfae</i> V31-2.	206
Figure C-6 : Distribution du MSS moyen ajusté par répétition des lignées tunisiennes de <i>Medicago truncatula</i> quatre semaines après inoculation par <i>Verticillium alfalfae</i> V31-2.	210
Figure C-7 : AUDPC des 90 accessions de la population tunisienne Soliman de <i>Medicago truncatula</i>	212
Figure C-8 : Répartition géographique des accessions de <i>Medicago truncatula</i> de la population Soliman.	212
Figure C-9 : Colonisation des parties aériennes de 90 accessions de <i>Medicago truncatula</i> issues de la population tunisienne Soliman par <i>Verticillium alfalfae</i> V31-2 en fonction du MSS.....	214
Figure C-10 : Manhattan plots obtenus suite à l'analyse de GWAS de la réponse à <i>Verticillium alfalfae</i> V31-2 au sein de l'espèce <i>Medicago truncatula</i>	216

Figure C-11 : Position des gènes candidats à la résistance à <i>Verticillium alfalfae</i> V31-2 sur le pic du chromosome 7 détecté à partir des phénotypes AUDPC, MSS et Asym.....	218
Figure C-12 : Domaines fonctionnels prédits pour la protéine F-BOX encodée par le gène Medtr7g070440 (A) et la protéine SEC14 encodée par le gène Medtr7g070480 (B).....	218
Figure C-13 : Position des gènes candidats à la résistance à <i>Verticillium alfalfae</i> V31-2 sur le pic du chromosome 1 détecté à partir des phénotypes AUDPC, MSS et Asym.....	220
Figure C-14 : Domaine fonctionnel prédit pour la protéine MATH encodée par le gène Medtr1g042160.1.....	220
Figure C-15 : Position des gènes candidats à la résistance à <i>Verticillium alfalfae</i> V31-2 sur le pic du chromosome 7 détecté à partir du paramètre xmid.....	222
Figure C-16 : Diagramme en boîte à moustaches des scores maximum de symptômes (MSS) des HIFs LR4 et LR5 issues de RILs présentant de l'hétérozygotie résiduelle sous le QTL majeur du chromosome 7.....	228
Figure C-17 : Q-Q plots des analyses réalisées sur l'AUDPC avec les modèles GLM (A) et MLM (B)..	232
Figure C-18 : Manhattan plots obtenus pour les phénotypes AUDPC (A), MSS (B) et taux de réisolement (C) selon le modèle GLM.	232
Figure C-19 : Positions des rétrotransposons <i>Tnt1</i> au sein du gène Medtr7g070280 des lignées mutantes NF17601 et NF20967.	236
Figure C-20 : Vérification par PCR de l'intégrité des inserts après insertion dans <i>Agrobacterium rhizogenes</i> ARqua1 pour la validation fonctionnelle des gènes Medtr7g070440 et Medtr7g070480.	238
Figure C-21 : Exemples de courbes de dissociation après qRT-PCR de l'amiR F-BOX sur un pool de racines de trois plantes transformées avec le vecteur vide (contrôle) ou avec l'amiR F-BOX issues du fond génétique A17.....	242
Figure C-22 : Expression relative des gènes Medtr7g070440 et Medtr7g070480 codant respectivement pour des protéines F-BOX et SEC14 dans des racines transgéniques exprimant les amiRs F-BOX et SEC14 et issues du fond génétique A17.....	242
Figure C-23 : Modélisation du développement des symptômes de la verticilliose et AUDPC chez des plantes chimériques transformées avec le vecteur vide ou le vecteur contenant l'amiR SEC14 ciblant le gène Medtr7g070480 issues du fond génétique A17.	244

Figure C-24 : Modélisation du développement des symptômes de la verticilliose et AUDPC chez des plantes chimériques transformées avec le vecteur vide ou le vecteur amiR SEC14 issues du fond génétique F83005.5.....	246
Figure C-25 : Expression relative du gène Medtr7g070480 codant une protéine SEC14 dans des racines transgéniques exprimant la séquence codante du gène Medtr7g070480 et issues des fonds génétiques A17 et F83005.5.	248
Figure C-26 : Modélisation du développement des symptômes de la verticilliose et AUDPC chez des plantes chimériques transformées avec le vecteur vide ou le vecteur de sur-expression contenant la séquence codante du gène Medtr7g070480 issues du fond génétique A17.....	250
Figure C-27 : Modélisation du développement des symptômes de la verticilliose et AUDPC chez des plantes chimériques transformées avec le vecteur vide ou le vecteur de sur-expression contenant la séquence codante du gène Medtr7g070480 issues du fond génétique F83005.5.	250
Figure C-28 : Colonisation à 7 jours après inoculation par <i>Verticillium alfalfae</i> V31-2 de racines transgéniques transformées avec le vecteur vide chez A17 (A) et F83005.5 (B) aux concentrations 0, 10 ³ , 10 ⁴ , 10 ⁵ , et 10 ⁶ spores/mL.....	252
Figure C-29 : Colonisation à sept jours après inoculation par <i>Verticillium alfalfae</i> V31-2 (A) et accroissement en sept jours après inoculation (B) de racines transgéniques transformées avec le vecteur vide issues de trois génotypes de <i>Medicago truncatula</i> connus pour leur réponse contrastée à <i>Verticillium alfalfae</i> V31-2 en huit répétitions indépendantes (A17, résistant et F83005.5 et SA03780 sensibles).	254
Figure C-30 : Expression du gène SEC14 analysée par qRT-PCR dans des racines transgéniques transformées avec le vecteur amiR SEC14 (A) ou avec le vecteur surexp SEC14 (B) et issues du fond génétique A17.	256
Figure C-31 : Colonisation à sept jours après inoculation par <i>Verticillium alfalfae</i> V31-2 (A) et accroissement en sept jours après inoculation (B) de racines transgéniques transformées avec le vecteur vide, le vecteur amiR SEC14 et le vecteur surexp SEC14 issues du génotype A17 pour 5 répétitions indépendantes.	256
Figure C-32 : Expression du gène SEC14 analysée par qRT-PCR dans des racines transgéniques transformées avec le vecteur amiR SEC14 ou avec le vecteur surexp SEC14 et issues du fond génétique F83005.5.....	260
Figure C-33 : Séquence génomique de la cible de l'amiR SEC14 chez A17 et F83005.5.	260

Figure C-34 : Colonisation à sept jours après inoculation par <i>Verticillium alfalfae</i> V31-2 (A) et accroissement en sept jours après inoculation (B) de racines transgéniques transformées avec le vecteur vide, le vecteur amiR SEC14 et le vecteur surexp SEC14 issues du génotype F83005.5 pour 3 répétitions indépendantes.	260
Figure C-35 : Positions des 33 SNPs dans la séquence codante du gène Medtr7g074080 (V4.0) montrant une substitution entre l'accension de référence A17 et au moins une des 246 accessions de la collection MtHapmap et identification des 15 substitutions non synonymes au sein de la protéine SEC14.	264
Figure C-36 : Structure tertiaire prédite de la protéine SEC14 encodée par Medtr7g074080 chez A17.	264
Figure C-37 : Répartition géographique des 14 accessions sélectionnées pour l'étude détaillée des polymorphismes de séquence dans le gène Medtr7g074080 et pour l'étude de son expression racinaire en réponse à l'inoculation par <i>Verticillium alfalfae</i> V31-2.....	264
Figure C-38 : Distribution du MSS corrigé moyen des 203 accessions du projet Hapmap dont la réponse à <i>Verticillium alfalfae</i> V31-2 a été évaluée pour l'étude GWAS en fonction de l'acide aminé 423 de la protéine SEC14.	266
Figure C-39 : Distribution des AUDPC des 14 lignées pour 3 répétitions biologiques.	268
Figure C-40 : Fold change de l'expression du gène SEC14 (Medtr7g070480) en réponse à l'inoculation par <i>Verticillium alfalfae</i> V31-2 dans les racines de 7 accessions sensibles et résistantes de <i>Medicago truncatula</i> à un jour après inoculation.....	272
Figure C-41 : Alignement des séquences protéiques codées par Medtr7g070480 de <i>Medicago truncatula</i> et de deux protéines codées par les allèles MSAD_291189 et MSAD_311522 du gène orthologue à Medtr7g070480 chez <i>Medicago sativa</i> CALD.....	274
Figure C-42 : Expression du gène orthologue à Medtr7g070480 MSAD_291189 chez différents génotypes de <i>Medicago sativa</i> , dans différents organes et dans différentes conditions.	274
Figure C-43 : <i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0 à 26 jours après inoculation racinaire en condition contrôle (A) et inoculées par <i>Verticillium alfalfae</i> V31-2 (B).....	280
Figure C-44 : Evaluation de la pathogénicité de <i>Verticillium alfalfae</i> V31-2 et de trois méthodes d'inoculation chez <i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0 pour deux répétitions indépendantes 26 jours après inoculation.....	280
Figure C-45 : <i>Nicotiana benthamiana</i> et <i>Nicotiana tabacum</i> 46-8 à 26 jours après inoculation racinaire en condition contrôle (A et C) et inoculées par <i>Verticillium alfalfae</i> V31-2 (B et D).	284
Figure C-46 : Evaluation de la pathogénicité de <i>Verticillium alfalfae</i> V31-2 chez <i>Nicotiana</i> sp.....	284

Figure C-47 : Evaluation de la pathogénicité de <i>Verticillium alfalfae</i> V31-2 chez <i>Lotus</i> sp. à 41 jours après inoculation racinaire.....	288
Figure C-48 : Positions du rétrotransposon <i>LORE1</i> au sein du gène Lj1g3v2391210 pour les lignées mutantes 30005652, 30073834 et 30106478.....	292
Figure D-1 : Phases intermédiaires de colonisation par <i>Verticillium longisporum</i> VL43 exprimant une GFP des racines de l'accession sensible Col-0 d' <i>Arabidopsis thaliana</i> (extrait de Reusche <i>et al.</i> , 2014).	308
Figure D-2 : Localisation de QTLs contrôlant la résistance à <i>Verticillium longisporum</i> chez <i>Arabidopsis thaliana</i> pour différents traits phénotypiques (extrait de Häffner <i>et al.</i> , 2014).....	310
Figure D-3 : Principe de la sélection génomique (extrait de Zhao <i>et al.</i> , 2015).....	324
Figure D-4 : Précision de prédiction de la résistance à <i>Verticillium alfalfae</i> V31-2 chez <i>Medicago truncatula</i> de cinq algorithmes de prédiction génomique (G-BLUP, RR-BLUP, BayesB, RKHS, LASSO) et de WhoGEM (extrait de Gentzbittel <i>et al.</i> , soumis).	326
Figure D-5 : Représentation des différents types de phosphoinositides (extrait de Ghosh and Bankaitis, 2011).....	328
Figure D-6 : Domaines architecturaux des protéines de la famille des SEC14 chez les eucaryotes (extrait de Ghosh and Bankaitis, 2011).....	330
Figure D-7 : Arbre phylogénétique des protéines SEC14 de <i>Medicago truncatula</i>	332
Figure D-8 : Modèle de la fonction du miR1514a chez les légumineuses (extrait de Sosa-Valencia <i>et al.</i> , 2017b).	334
Figure D-9 : Activité antibactérienne (A) et antifongique/antioomycètes (B) des oxylipines (extrait de Prost <i>et al.</i> , 2005).	344
Figure D-10 : Voies enzymatiques et non enzymatiques permettant la synthèse des signaux dérivés des acides gras (extrait de Walley <i>et al.</i> , 2013).	346
Figure D-11 : Modèle simplifié de la dynamique protéique et vésiculaire dans le système immunitaire végétal (extrait de Underwood, 2016).	348
Figure D-12 : Schéma illustrant l'accumulation et la livraison de protéines de sécrétion au niveau du col de l'hyphe de <i>Verticillium dahliae</i> (extrait de Zhou <i>et al.</i> , 2017).	354
Figure D-13 : Relations taxonomiques entre dix espèces de légumineuses (reproduit à partir de Lee <i>et al.</i> , 2017).....	376

Figure D-14 : Relations macrosynténiques simplifiées entre dix espèces de légumineuses (extrait de Lee <i>et al.</i> , 2017).....	378
Figure E-1 : Répartition géographique des 211 accessions de <i>Medicago truncatula</i> dont l'origine est documentée et dont la réponse à <i>Verticillium alfalfae</i> V31-2 a été évaluée.	396
Figure F-1 : Q-Q plots des analyses de GWAS réalisées sur l'AUDPC avec les modèles GLM (A), GLM incluant la matrice de population (B), MLM (C) et MLM incluant la matrice de population (D).	419
Figure F-2 : Manhattan plots obtenus suite à l'analyse de GWAS de la réponse à <i>Verticillium alfalfae</i> V31-2 au sein de l'espèce <i>Medicago truncatula</i> pour les phénotypes AUDPC (A), MSS (B) et pour le paramètre de modélisation Asym (C).	425
Figure F-3 : Génotypage de trois lignées d'insertion <i>LORE1</i> de <i>Lotus japonicus</i> mutées dans le gène Lj1g3v2391210 orthologue de Medtr7g070480.	433

Liste des tableaux

Tableau A-1 : Estimation des pertes de rendements mondiales dues aux ravageurs sur le blé, le maïs et le coton (extrait de Popp <i>et al.</i> , 2013).....	4
Tableau A-2 : Production annuelle et pertes économiques et de rendement causées par la verticilliose chez ses principaux hôtes à intérêt agronomique (extrait de FAO, 2013).....	24
Tableau A-3 : Exemples de MAMPs/DAMPs et leurs PRRs correspondantes (extrait de Muthamilarasan and Prasad, 2013).....	40
Tableau A-4 : Exemples d'effecteurs, leurs sources, leurs cibles, leurs protéines ERR et leurs structures (extrait de Muthamilarasan and Prasad, 2013).....	44
Tableau A-5 : Exemples de gènes <i>R</i> impliqués dans la résistance qualitative aux pathogènes (extrait de Kushalappa <i>et al.</i> , 2016).	56
Tableau A-6 : Exemples de gènes codant les RRM et RRP impliqués dans la résistance aux pathogènes (extrait de Kushalappa <i>et al.</i> , 2016).	58
Tableau A-7 : Gènes impliqués dans la QDR et méthodes d'identification et de validation fonctionnelle (adapté de French <i>et al.</i> , 2016).	60
Tableau A-8 : Pathogènes de <i>Medicago sativa</i> et pathogènes étudiés chez <i>Medicago truncatula</i>	96
Tableau A-9 : Liste des phénotypes quantitatifs étudiés en utilisant des populations de RILs de <i>Medicago truncatula</i> (extrait de Garmier <i>et al.</i> , 2017).....	108
Tableau B-1 : Génotypes des lignées RILs des populations LR4 et LR5 en génération F5 au niveau du QTL majeur de résistance à <i>Verticillium alfalfae</i> V31-2 du chromosome 7.....	136
Tableau B-2 : Origines et phénotypes de maladie des 14 accessions choisies pour l'étude de l'expression de gène candidats à la résistance à <i>Verticillium alfalfae</i> V31-2	136
Tableau B-3 : Caractéristiques des lignées mutantes <i>Tnt1</i> de <i>Medicago truncatula</i> dans le gène Medtr7g070480 codant pour une protéine SEC14.	138
Tableau B-4 : Composition du milieu Fahraeus.....	140
Tableau B-5 : Caractéristiques des lignées mutantes <i>LORE1</i> de <i>Lotus japonicus</i> dans le gène Lj1g2391210, orthologue du gène Medtr7g070480 codant pour une protéine SEC14.....	142
Tableau B-6 : Composition du milieu ¼ Broughton and Dilworth.....	142
Tableau B-7 : Composition du milieu MS utilisé pour la culture de racines transgéniques.....	148

Tableau B-8 : Composition du tampon d'extraction d'ADN génomique.....	164
Tableau B-9 : Mélange réactionnel pour le traitement d'1µg d'ARN à la DNase.....	168
Tableau B-10 : Mélange réactionnel pour la synthèse d'ADN complémentaire pour un échantillon.	168
Tableau B-11 : Mélange réactionnel pour la qPCR et RT-qPCR pour un échantillon.	168
Tableau B-12 : Amorces utilisées lors des qPCR et RT-qPCR.....	168
Tableau B-13 : Programme qPCR et RT-qPCR.	170
Tableau B-14 : Mélange réactionnel pour la ligation des adaptateurs aux miRs matures pour un échantillon.....	170
Tableau B-15 : Mélange réactionnel pour la synthèse des ADNc des miRs matures pour un échantillon.	170
Tableau B-16 : Mélange réactionnel pour la RT-qPCR des miRs matures pour un échantillon.	170
Tableau B-17 : Programme RT-qPCR des miRs matures.	170
Tableau B-18 : Amorces utilisées pour la RT-qPCR sur les miRs matures.	172
Tableau B-19 : Mélange réactionnel pour la PCR standard pour un échantillon.....	172
Tableau B-20 : Programme PCR standard.	172
Tableau B-21 : Mélange réactionnel pour purification de produits PCR pour un échantillon.....	172
Tableau B-22 : Mélange réactionnel pour la réaction de séquence pour un échantillon.....	174
Tableau B-23 : Programme de réaction de séquence Sanger.	174
Tableau B-24 : PCR successives nécessaires à l'obtention des amiRs (extrait de Schwab, 2005).....	174
Tableau B-25 : Séquences des amorces utilisées pour le clonage.	176
Tableau B-26 : Mélange réactionnel pour la PCR haute fidélité pour un échantillon.....	176
Tableau B-27 : Programme PCR haute fidélité.....	176
Tableau B-28 : Souches bactériennes et conditions de sélection.	180
Tableau B-29 : Mélange réactionnel pour la réaction de recombinaison LR pour un échantillon.	184
Tableau B-30 : Interprétation des résultats de génotypage des mutants d'insertion <i>M. truncatula</i> et <i>L. japonicus</i>	188
Tableau B-31 : Amorces pour le génotypage des mutants d'insertion chez <i>Lotus japonicus</i> et <i>Medicago truncatula</i>	190

Tableau B-32 : Programme PCR en "touchdown" utilisé pour le génotypage des mutants <i>LORE1 Lotus japonicus</i> et avec les amorces gène spécifique/ <i>Tnt1</i> chez les mutants <i>Tnt1</i> de <i>Medicago truncatula</i>	190
Tableau B-33 : Programme PCR utilisé pour le génotypage des mutants d'insertion <i>Tnt1</i> de <i>Medicago truncatula</i> avec les amorces GSP sens et anti-sens.	190
Tableau B-34 : Nombre d'événements de transformation obtenus pour les hairy roots par fond génétique et par vecteur.....	194
Tableau C-1 : Tables d'ANOVA des phénotypes MSS, AUDPC, Asym, xmid et scal obtenus pour 261 accessions de <i>Medicago truncatula</i> inoculées par <i>Verticillium alfalfae</i> V31-2.....	204
Tableau C-2 : Table d'ANOVA pour le phénotype de Taux de réisolement pour 257 accessions de <i>Medicago truncatula</i> inoculées par <i>Verticillium alfalfae</i> V31-2.....	204
Tableau C-3 : Tables d'ANOVA des phénotypes MSS et AUDPC des 52 accessions tunisiennes de <i>Medicago truncatula</i> inoculées par <i>Verticillium alfalfae</i> V31-2 et appartenant aux populations TN1, TN7, TN8 et TN9.	210
Tableau C-4 : Tables d'ANOVA des phénotypes MSS, AUDPC et Taux de réisolement de <i>Verticillium alfalfae</i> des 90 accessions de la région de Soliman de <i>Medicago truncatula</i> inoculées par V31-2....	214
Tableau C-5 : Résultats de génotypage des lignées NF17601 et NF20967.	236
Tableau C-6 : Effectifs de plantes chimériques transformées avec le vecteur vide ou le vecteur contenant l'amiR ciblant le gène Medtr7g070480 et rendement de transformation par répétitions indépendantes.....	244
Tableau C-7 : Moyennes et écarts-types des phénotypes et paramètres de modélisation de la verticilliose des plantes chimériques transformées avec le vecteur vide ou le vecteur amiR SEC14 et inoculées par <i>Verticillium alfalfae</i> V31-2.	244
Tableau C-8 : Tables d'ANOVA des phénotypes MSS et AUDPC des plantes chimériques transformées avec le vecteur vide ou le vecteur amiR SEC14.....	246
Tableau C-9 : Effectifs de plantes chimériques transformées avec le vecteur vide ou le vecteur contenant la séquence codante du gène Medtr7g070480 et rendement de transformation par répétitions indépendantes.....	248
Tableau C-10 : Moyennes et écarts-types des phénotypes et paramètres de modélisation de la verticilliose des plantes chimériques transformées avec le vecteur vide ou le vecteur contenant la séquence codante de Medtr7g070480 et inoculées par <i>Verticillium alfalfae</i> V31-2.....	248

Tableau C-11 : Tables d'ANOVA des phénotypes MSS et AUDPC des plantes chimériques transformées avec le vecteur vide ou le vecteur surexp SEC14.	252
Tableau C-12 : Table d'ANOVA du phénotype colonisation à sept jours après inoculation des racines transgéniques transformées avec le vecteur vide chez A17 et F83005.5.	252
Tableau C-13 : Tables d'ANOVA des phénotypes colonisation à sept jours après inoculation (A) et accroissement racinaire en sept jours (B) des racines transgéniques transformées avec le vecteur vide chez A17, F83005.5 et SA03780.	254
Tableau C-14 : Tables d'ANOVA des phénotypes colonisation à sept jours après inoculation (A) et accroissement racinaire en sept jours (B) des racines transgéniques transformées avec le vecteur vide, le vecteur amiR SEC14 et le vecteur surexp SEC14 chez A17.....	258
Tableau C-15 : Tables d'ANOVA des phénotypes colonisation à sept jours après inoculation (A) et accroissement racinaire en sept jours (B) des racines transgéniques transformées avec le vecteur vide, le vecteur amiR SEC14 et le vecteur surexp SEC14 chez F83005.5.	262
Tableau C-16 : SNPs pour lesquels le déséquilibre de liaison R^2 avec le SNPs 26021195 est supérieur à 0,7.....	266
Tableau C-17 : Table d'ANOVA de la moyenne des AUDPC par répétition et par accession 32 jours après inoculation par <i>Verticillium alfalfae</i> V31-2.....	268
Tableau C-18 : Tables d'ANOVA du niveau d'expression des gènes de réponse aux stress biotiques (<i>PR4</i> , <i>PAL</i> , <i>PR5</i>) par répétition et par accession au moment de l'inoculation par <i>Verticillium alfalfae</i> V31-2 (0 dpi, A) et à 1 dpi (B).....	270
Tableau C-19 : Analyse de l'expression de gènes marqueurs de stress biotique en réponse à l'inoculation par <i>Verticillium alfalfae</i> V31-2 dans les racines de 14 accessions sensibles et résistantes de <i>Medicago truncatula</i>	270
Tableau C-20 : Tables d'ANOVA du niveau d'expression du gène <i>SEC14</i> (Medtr7g070480) par accession au moment de l'inoculation par <i>Verticillium alfalfae</i> V31-2 (0 dpi, A), à 1 dpi (B) et par phénotype de réponse à <i>Verticillium alfalfae</i> V31-2 à 1 dpi (C).....	272
Tableau C-21 : Génotypes des descendants des mutants <i>LORE1</i> dans le gène Lj1g3v2391210 de <i>Lotus japonicus</i> , orthologue du gène Medtr7g070480.....	294
Tableau E-1 : Phénotype de réponse à l'inoculation par différents pathogènes racinaires des accessions A17 et F83005.5.	392
Tableau F-1 : Caractéristiques des QTLs contre <i>Verticillium</i> sp. décrits chez <i>Medicago truncatula</i> ...	405

Tableau F-2 : Accessions et nombre de plantes utilisées par accession par répétition pour l'analyse GWAS.....	407
Tableau F-3 : Accessions issues de la population tunisienne Soliman de <i>Medicago truncatula</i> utilisées pour l'étude de génétique d'association.....	415
Tableau F-4 : Composition du milieu Murashige & Skoog, vitamines incluses (extrait de Murashige and Skoog, 1962).....	417
Tableau F-5 : Gènes candidats à la résistance à <i>Verticillium alfalfae</i> V31-2 identifiés par l'analyse de génétique d'association au sein de 246 accessions de la collection MtHapMap.	421
Tableau F-6 : Rendement en nombre de gousses des lignées de RILs LR4 et LR5 hétérozygotes sous le QTL de résistance à <i>Verticillium alfalfae</i> V31-2.....	427
Tableau F-7 : Gènes candidats à la résistance à <i>Verticillium alfalfae</i> V31-2 identifiés par l'analyse d'association au sein de la population Soliman.	429

A. INTRODUCTION

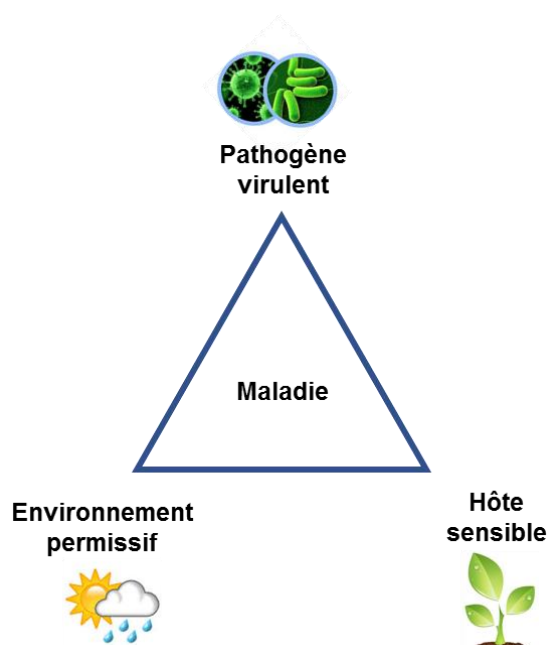


Figure A-1 : Illustration du concept du triangle de la maladie.

Trois conditions sont nécessaires à l'établissement de la maladie chez les plantes : un hôte sensible, un pathogène virulent et un environnement favorable.

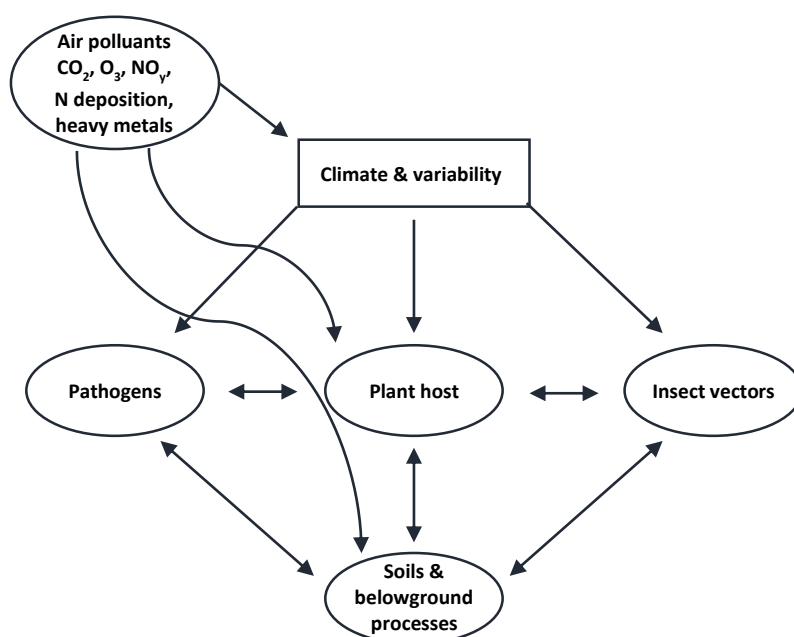


Figure A-2 : Expansion du triangle de la maladie par des modifications chimiques et physiques de l'environnement (reproduit à partir de Chappelka and Grulke, 2016).

L'expansion du triangle de la maladie incorpore l'influence de la composition de l'air et de la variabilité environnementale sur la santé de la plante hôte et sur sa sensibilité, sur la virulence du pathogène, et sur la santé des insectes vecteurs (quand ils font partie du pathosystème). Les différentes interactions entre pathogène, vecteurs, climats et sols (ces derniers sont très importants dans le cas de pathogènes racinaires) sont représentées par des flèches.

NO_y : oxydes d'azote et composés formés à partir de l'oxydation des NO_x.

I. Les maladies des plantes

La plupart des plantes sont immunisées ou résistantes à la majorité des micro-organismes avec lesquelles elles sont en contact. La pénétration ou l'invasion des plantes par ces micro-organismes peuvent être limitées par des barrières physiques ou chimiques. Dans le cas d'une invasion réussie, le développement de la maladie est influencé par plusieurs conditions : l'environnement, la sensibilité de la plante hôte et la virulence du pathogène (Schoeneweiss, 1975). Ce concept est illustré par le triangle de la maladie **Figure A-1**.

Au cours des cent dernières années, la modification rapide de l'environnement physique et chimique de la terre a contribué à émettre un nouveau modèle prenant en compte les changements environnementaux (**Figure A-2**). En effet, les modifications de l'environnement physico-chimique de la terre influencent le climat et sa variabilité, la santé de la plante hôte, et la composition des sols (Chappelka and Grulke, 2016). Par exemple, à l'ouest des Etats-Unis, des modifications climatiques ont engendré des changements physiologiques chez les plantes hôtes ligneuses telles qu'une augmentation de leur métabolisme C3 ou encore des perturbations des cycles de vie des pathogènes tels que *Phytophthora ramorum* dont le développement nécessite un fort taux d'humidité (pathogène causant notamment la mort subite des chênes sur différentes espèces ligneuses comme *Notholithocarpus densiflorus*, *Quercus agrifolia*, *Quercus falcata*, *Quercus rubra*, ou encore *Larix kaempferi*) (Sturrock *et al.*, 2011; Matyssek *et al.*, 2014).

1. Impacts agronomiques et écologiques des maladies des plantes

a. Conséquences agronomiques des maladies des plantes

Depuis le développement de l'agriculture, les cultivateurs ont dû faire face à une multitude de ravageurs (insectes, nématodes, rongeurs...), de maladies (virus, bactéries, champignons) et de mauvaises herbes (rentrant en compétition avec les plantes cultivées pour les ressources naturelles du milieu) mais également aux aléas climatiques. Afin de maintenir une production suffisante pour nourrir une population toujours plus nombreuse, les hommes contrôlent ces organismes grâce à des méthodes physiques (désherbage mécanique, solarisation des sols), biologiques (rotation des cultures, prédateurs, sélection variétale) et chimiques (pesticides) (Oerke, 2006, 2007; Popp *et al.*, 2013).

Les maladies des plantes causent des pertes quantitatives (diminution des rendements), des pertes qualitatives (taux protéique dans les grains de blé trop faible) et peuvent même rendre impropre à la consommation la culture (production de mycotoxines par *Fusarium graminearum* chez le blé). Des exemples de pertes de rendement mondiales en fonction du type de ravageur pour les cultures de blé, maïs et coton sont présentés dans le **Tableau A-1**. La grande famine en Irlande de 1845 à 1847 est la

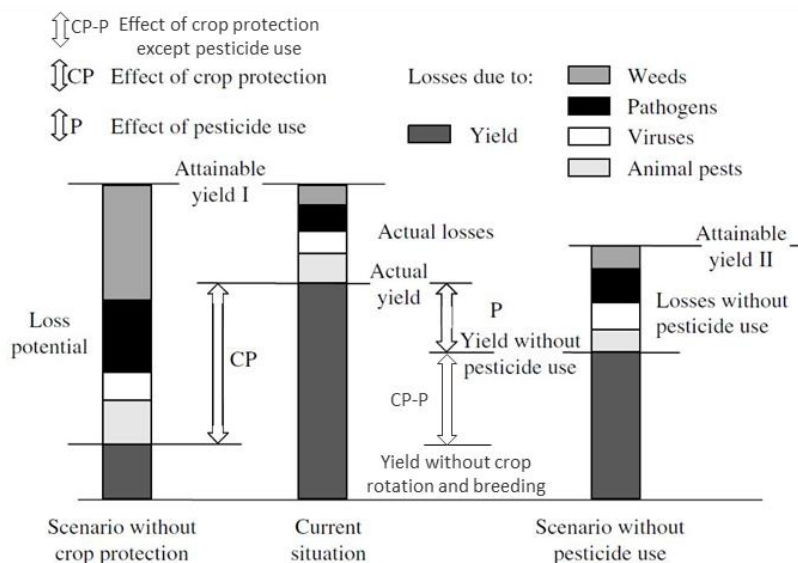


Figure A-3 : Pertes mondiales de rendement en fonction du type d'organisme et en fonction des méthodes de protection mises en place (adapté de Oerke, 2006).

Tableau A-1 : Estimation des pertes de rendements mondiales dues aux ravageurs sur le blé, le maïs et le coton (extrait de Popp *et al.*, 2013).

de l'oppet en, 2019).

Période	Rendement (kg/ha)	Pourcentage de pertes			
		Mauvaises herbes	Ravageurs	Maladies	Total
Blé					
1964/1965 ^a	1 250	9,8	5,0	9,1	23,9
1988/1990 ^b	2 409	12,3	9,3	12,4	34,0
1996/1998 ^c	2 610	9,0	8,0	12,0	29,0
2001/2003 ^d	2 691	7,7	7,9	12,6	28,2
Maïs					
1964/1965 ^a	2 010	13,0	12,4	9,4	37,8
1988/1990 ^b	3 467	13,1	14,5	10,8	38,3
1996/1998 ^c	4 190	10,0	10,0	10,0	30,0
2001/2003 ^d	4 380	10,5	9,6	11,2	31,2
Coton					
1964/1965 ^a	1 029	4,5	11,0	9,1	24,6
1988/1990 ^b	1 583	11,8	15,4	10,5	37,7
1996/1998 ^c	1 630	7,0	12,0	10,0	29,0
2001/2003 ^d	1 702	5,6	12,3	7,9	28,8

^a (Cramer, 1967) ; ^b (Oerke *et al.*, 1994) ; ^c (Oerke and Dehne, 2004) ; ^d (Oerke, 2006)

conséquence d'un des exemples les plus connus de pertes de rendement par manque de protection de culture. En effet, les cultures de pommes de terre ont été dévastées par le mildiou (*Phytophthora infestans* a causé une perte de rendement d'environ 40%), cette famine a coûté la vie à environ un million d'individus et provoqué l'émigration de deux millions de personnes. Cette crise est également à l'origine du développement de la phytopathologie (Agrios, 1988; Popp *et al.*, 2013).

Bien que non actualisées, les données présentées **Figure A-3** permettent de visualiser des pertes de rendement sans utilisation de pesticides (P) ou sans protection de culture (CP) par rapport à un scénario où pesticides et autres moyens de protections de culture sont utilisés. La différence CP-P permet de visualiser les pertes de rendements estimées sans utilisation de pesticides mais en utilisant d'autres moyens de protection de culture tels que notamment la sélection variétale et la rotation des cultures. Cette figure permet de constater que plus de la moitié des pertes de rendement agricole observées sans protection des cultures ne s'explique pas par l'utilisation de pesticides mais par les pratiques culturales et variétés sélectionnées (Oerke, 2006, 2007; Popp *et al.*, 2013). De plus, l'utilisation des pesticides sur les cultures est associée à des effets indésirables sur l'environnement, la santé et à l'apparition de résistance à ces produits chimiques. En effet, la diminution du nombre de substances actives (produits retirés du marché car pas assez spécifiques et/ou trop polluants), favorise l'émergence de ce genre de résistance. Par exemple, plusieurs familles de plantes ont montré des résistances à l'herbicide glyphosate par différents mécanismes : du fait d'une nécrose rapide des feuilles (résistance décrite chez *Ambrosia trifida* (grande herbe à poux)), grâce à une amélioration de la séquestration du glyphosate dans la vacuole ou encore par de multiples substitutions d'acides aminés au sein de la protéine cible du glyphosate EPSPS (5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase, résistance décrite chez *Eleusine indica* (Éleusine des Indes)) (Duke and Powles, 2008; Busi *et al.*, 2013). Ainsi, d'après la Commission Européenne, il y avait plus de mille substances bioactives autorisées en 2001, contre 250 en 2009. Cette tendance à la diminution de substances chimiques homologuées est aujourd'hui encore d'actualité. C'est pourquoi le maintien des rendements des cultures passe par la sélection de variétés résistantes aux maladies ainsi que par la mise en œuvre d'une protection intégrée (utilisation combinée de produits phytosanitaires et de méthodes mécaniques et biologiques comme des prédateurs des ravageurs des cultures) (Barzman *et al.*, 2015).

b. Conséquences écologiques des maladies des plantes

Les agents pathogènes sont impliqués dans la composition, l'évolution et la succession des populations de plantes. En effet, ils peuvent être responsables de la mortalité et de la réduction de la fitness des plantes (capacité des plantes à produire une descendance fertile) mais aussi de l'augmentation de la diversité génétique des plantes hôtes (Gilbert, 2002; Mordecai, 2011; Bever *et al.*, 2015).

La modélisation des interactions entre plantes et pathogènes permet d'illustrer les différentes conséquences écologiques des maladies des plantes. Elles sont au nombre de trois : i) l'extinction de l'hôte, ii) la coexistence de l'hôte et du pathogène ou iii) l'extinction du pathogène provoquant ainsi le maintien d'une population non atteinte par la maladie. Pour la plupart des pathogènes, les modèles prennent en compte la densité des plantes hôtes. En effet, le nombre total d'individus malades est un facteur crucial pour la dispersion de la maladie chez de nombreux pathogènes. Par exemple, la relation entre densité de plantes et incidence de la maladie a été étudiée chez une combinaison de 46 hôtes et pathogènes. Dans la plupart des cas, il existe une corrélation positive entre densité de population et maladies fongiques. Les exceptions observées sont dues à une présence réduite d'inoculum par rapport à une forte densité de l'hôte. Par contre, les maladies virales propagées par des vecteurs sont généralement corrélées négativement à la densité des plantes car soit le nombre de vecteurs est limitant, soit le comportement des vecteurs change en fonction des modifications environnementales (Burdon and Chilvers, 1982; Thrall *et al.*, 1993).

Le potentiel destructeur et la virulence des pathogènes introduits dans des milieux naturels peuvent conduire à l'extinction de l'hôte. Ce phénomène illustre l'importance écologique de la co-évolution plante/pathogène. Cette co-évolution est largement gouvernée par le coût de la résistance chez la plante hôte et par le coût de la virulence chez le pathogène et est une cause du maintien de la diversité génétique au sein des populations de plantes. Par exemple du côté des plantes, le gène *ACD6* (Accelerated cell death 6) d'*Arabidopsis thaliana* a été identifié par analyse QTL (quantitative trait loci) pour son implication dans la vitesse d'initiation de formation des feuilles à partir d'une population de RILs (Recombinant Inbred Lines) issue du croisement entre Col-0 et Est-1. L'allèle *ACD6* d'Est-1 provoque une apparition plus lente des feuilles d'*Arabidopsis thaliana*, une apparition de nécroses sur les feuilles adultes ainsi qu'une production de biomasse foliaire inférieure à celle de Col-0. Cet allèle confère également une meilleure résistance à la bactérie pathogène hémibiotrophique *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, aux pathogènes biotrophes *Golovinomyces orontii* T1 (oïdium), *Golovinomyces cichoracearum* UCSC1 (oïdium) et *Hyaloperonospora arabidopsidis* Noco2 (mildiou). Chez *Arabidopsis thaliana* Est-1, le coût de la résistance est donc visible en terme de biomasse foliaire (Todesco *et al.*, 2010). Du côté pathogène, une étude a été réalisée sur le coût du plasmide Ti (tumeur-inducing) d'*Agrobacterium tumefaciens*. Dans des conditions de cultures limitantes (peu de carbone ou peu d'azote dans le milieu de culture), il existe un coût du maintien du

plasmide sur la fitness (succès reproducteur, valeur sélective ou adaptative) de la bactérie. En effet, une quantité identique de bactéries appartenant à deux souches d'*Agrobacterium tumefaciens* (souche 15955 possédant ou non le plasmide Ti) a été mise en culture dans un milieu pauvre. Au bout de 35 générations, les bactéries de la souche sans le plasmide Ti sont plus abondantes que celles de la souche portant le plasmide Ti (Platt *et al.*, 2012). Dans le cas de la rouille couronnée (*Puccinia coronata*), la résistance de l'avoine (*Avena sativa*) est race spécifique et peut être conférée par différents gènes *PC*, cible des gènes d'avirulence du pathogène. La virulence de vingt-neuf souches de *Puccinia coronata* a été évaluée en déterminant le nombre de gènes de virulence possédé par chacune des souches, cette virulence permet également de déterminer leur spectre d'hôte. Il s'avère que la virulence de la souche est corrélée au temps de latence avant reproduction : plus la souche est virulente et plus ce temps est long (Bruns *et al.*, 2014).

La mortalité des plantes causée par des maladies n'influence les populations végétales que si la diminution du nombre de plantes conduit à une diminution du nombre de graines produites. En effet, la diminution de densité de plantes en limitant la compétition pour les ressources naturelles peut permettre une augmentation du rendement par plante et maintenir la production de graines au sein de cette population (Alexander and Holt, 1998). L'infection des plantes a également une incidence sur différentes générations de plantes hôtes. Ainsi, les plantes maternelles infectées peuvent produire moins de graines réduisant alors potentiellement leur fitness mais elles peuvent également transmettre à leur descendance des défenses induites augmentant la résistance aux agresseurs. Cet effet maternel a été observé en réponse à l'herbivore *Pieris rapae* chez le radis sauvage *Raphanus raphanistrum*. L'attaque du radis sauvage par cette chenille spécifique entraîne une accumulation dix fois plus importante d'indole gluconinolates au niveau des feuilles et une augmentation de 30% des trichomes à la surface des feuilles. Après mise en contact des descendants des plantes attaquées avec *Pieris rapae*, les chenilles ont une masse 20% plus faible que les chenilles de plantes contrôles (Agrawal *et al.*, 1999). Chez *Arabidopsis thaliana*, un traitement à la flagelline (éliciteur des défenses des plantes) des plantes mères a montré une augmentation du taux de recombinaison génomique chez les descendants par rapport aux descendants des plantes non traitées. Les auteurs de cette étude ont conclu que la modification de facteurs environnementaux a conduit à une augmentation de la flexibilité du génome chez les descendants, pouvant ainsi accroître l'adaptabilité des plantes (Molinier *et al.*, 2006). Un exemple plus récent concerne la résistance induite à *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 chez *Arabidopsis thaliana*. La descendance des plantes inoculées par *Pst* DC3000 est en effet plus résistante à *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 et *Hyaloperonospora arabidopsidis* que les plantes contrôles (Luna *et al.*, 2012; Balmer *et al.*, 2015).

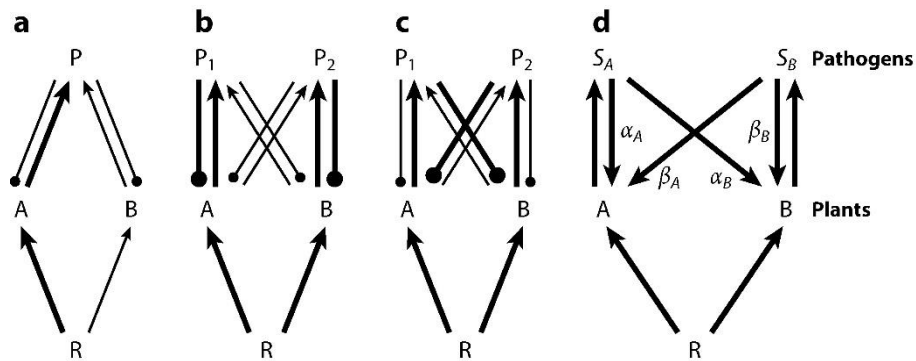


Figure A-4 : Représentation schématique des interactions plantes-pathogènes et de leurs effets sur la coexistence des différentes espèces de plantes (extrait de Bever *et al.*, 2015).

Les flèches représentent le sens des bénéfices, les points représentent la direction des effets délétères et l'épaisseur des traits correspond à l'intensité des effets.

a. Un unique pathogène (P) peut contribuer à la coexistence de différentes espèces de plantes (A et B) si le plus fort compétiteur pour les ressources (R) est également le plus vulnérable au pathogène.

b. Deux pathogènes possédant un impact différentiel sur deux espèces de plantes peuvent générer un contrôle négatif sur les plantes et contribuer à la coexistence des deux espèces lorsqu'ils ont le plus fort impact sur l'espèce qui croît le mieux.

c. Au contraire, si les pathogènes ont le plus fort impact négatif sur les plantes qui poussent le moins (comme par exemple dans le cas de différents niveaux de tolérance au pathogène), la dynamique des pathogènes génère un contrôle positif sur les espèces de plantes, créant parfois un état stable de la coexistence des espèces de plantes.

d. Les modifications du microbiome spécifique (S) aux espèces A et B peuvent être représentées respectivement par S_A et S_B . La modification du microbiome de l'espèce de plante A peut directement altérer sa croissance (α_A) et cela peut également altérer la croissance de l'espèce compétitrice B (α_B). De la même manière, une modification du microbiome de l'espèce B altère la croissance de l'espèce B (β_B) et indirectement celle de l'espèce A (β_A). Lorsque le coefficient d'interaction IS ($IS = (\alpha_A + \beta_B) - (\alpha_B + \beta_A)$) est négatif, les modifications des microbiomes des plantes contribuent à la coexistence des espèces végétales.

La compétition entre végétaux peut également être prise en compte lors de la modélisation de ces interactions car elle peut avoir des effets bénéfiques pour la survie de la plante. C'est le cas par exemple de la rouille causée par *Puccinia recondita* qui va diminuer fortement la croissance d'*Impatiens capensis* (Impatiens du Cap) à de hautes densités naturelles mais pas à de faibles densités de population (Lively *et al.*, 1995). D'autres types d'interactions entre plantes et pathogènes influençant la coexistence des différentes espèces de plantes sont présentés **Figure A-4**. Dans le cas d'une interaction entre un unique pathogène et deux espèces de plantes hôtes, la présence du pathogène n'influence la coexistence de ces deux espèces que si l'espèce la plus compétitrice pour les ressources est également celle qui est la plus vulnérable au pathogène (**Figure A-4-a**). Par exemple, la survie du saule des vanniers (*Salix viminalis*) est directement liée à sa capacité à capter la lumière. Or, une infection par la rouille *Melampsora epitea* provoque un ralentissement de la croissance de cet arbre, le saule se retrouve alors en compétition avec d'autres espèces végétales pour capter la lumière (Verwijst, 1993). Lorsque deux espèces de pathogènes spécialisés sont présents dans un milieu, elles peuvent contribuer à la coexistence de leurs hôtes respectifs en contrôlant individuellement la taille de la population de leur hôte si le pathogène le plus virulent a pour espèce hôte la plus compétitrice des espèces (**Figure A-4-b**). Ce modèle d'interaction peut être illustré par la compétition entre la légumineuse *Chamaecrista fasciculata* et la graminée prédominante *Andropogon gerardii* au Kansas. Ces deux espèces croissent mieux ensemble dans un sol provenant de la zone racinaire de *Chamaecrista* que dans un sol provenant de la zone racinaire d'*Andropogon*. Un réisolement des champignons présents dans ces deux différents types de sols a mis en évidence vingt-et-une espèces distinctes. Parmi ces espèces, cinq (un oomycète, un *Rhizoctonia*, un *Monascus*, et deux champignons non identifiés) sont uniquement présentes dans l'échantillon de sol provenant de la zone racinaire de *Chamaecrista*. L'inoculation des racines d'*Andropogon gerardii* dans un sol stérile par un mélange de ces cinq espèces montre une croissance plus faible des plantes par rapport aux témoins non inoculés. La présence de cette communauté différente de champignons dont certains sont pathogènes explique donc en partie la modification de la dominance de l'espèce *Andropogon gerardii* observée dans la nature. Néanmoins, les auteurs de cette étude n'ont pas effectué de réisolements des autres composants biotiques du sol telles que les bactéries, les différences de croissance ne peuvent donc pas uniquement être imputées à la présence de ces champignons (Holah and Alexander, 1999). Si les pathogènes ont le plus fort impact négatif sur les plantes qui poussent le moins (comme par exemple dans le cas de différents niveaux de tolérance au pathogène), la dynamique des pathogènes génère un contrôle positif sur les espèces de plantes, créant parfois un état de coexistence stable des espèces végétales (**Figure A-4-c**). Le dernier cas d'interaction entre plantes et pathogènes présenté est celui de la modification du microbiome spécifique (communautés microbiennes du sol S_A et S_B) des espèces de plantes hôtes A et B. En effet, ces modifications peuvent altérer les croissances des deux espèces directement (α_A et β_B) ou indirectement (α_B et β_A). Lorsque les effets intraspécifiques ($\alpha_A + \beta_B$) ont des

conséquences plus négatives sur la croissance des plantes que les effets interspécifiques (α_B et β_A), alors les microbiomes permettent également la coexistence des espèces de plantes (**Figure A-4-d**) (Revilla *et al.*, 2013; Bever *et al.*, 2015).

Les maladies des plantes peuvent également impacter la succession des espèces végétales au sein de leur milieu naturel. En Europe, la graminée *Ammophila arenaria* (Oyat ou roseau des sables) colonise, se développe sur les dunes de sable et décline lorsque les dunes sont stabilisées. Néanmoins, lorsque des nématodes et des agents pathogènes du sol se développent dans la rhizosphère de l'Oyat, une dégénérescence de cette espèce est observée et permet l'émergence d'une autre espèce de graminée résistante à ces pathogènes, *Festuca rubra* ssp. *arenaria* (Van der Putten and Peters, 1997).

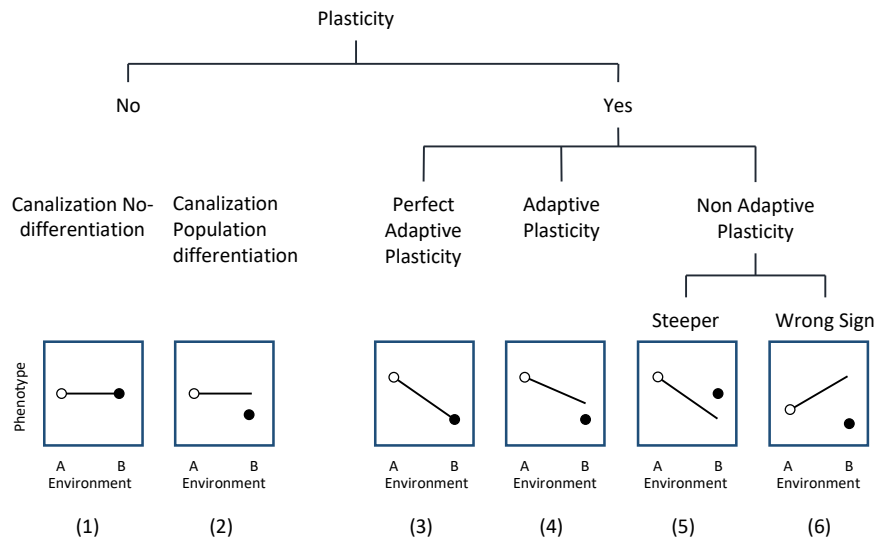


Figure A-5 : Schéma de la réponse plastique aux changements environnementaux (reproduit à partir de Palacio-López *et al.*, 2015).

Les points représentent le phénotype étudié dans les environnements A et B, environnement optimal des populations 1 (cercle vide) et 2 (cercle plein). Le trait représente la norme de réaction pour la population 1. L'extrémité de ce trait représente le phénotype moyen de la population 1 dans l'environnement B.

- (1). Il n'y a pas de plasticité phénotypique entre les deux environnements et les moyennes des phénotypes des populations 1 et 2 ne sont pas différentes.
- (2). Il n'y a pas de plasticité phénotypique entre les deux environnements et les moyennes des phénotypes des populations 1 et 2 sont différentes, la population 1 est plus performante que population 2 dans son propre environnement.
- (3). Plasticité adaptative parfaite, il existe une différence de phénotypes entre les deux environnements pour la population 1 et les phénotypes moyens des populations 1 et 2 dans l'environnement B sont identiques.
- (4). Plasticité adaptative, il existe une différence de phénotypes entre les deux environnements pour la population 1 et le phénotype moyen de la population 1 dans l'environnement B est meilleur que celui de la population 2.
- (5). Plasticité non adaptative, il existe une différence de phénotypes entre les deux environnements pour la population 1 et le phénotype moyen de la population 1 dans l'environnement B est moins bon que celui de la population 2.
- (6) : Plasticité non adaptative, il existe une différence de phénotypes entre les deux environnements pour la population 1 et le phénotype moyen de la population 1 dans l'environnement B est meilleur que celui de la population 2 dans l'environnement B et que celui de la population 1 dans l'environnement A.

2. Stratégies d'adaptation des plantes aux stress biotiques

Au sein des écosystèmes naturels dont fait partie le pathosystème *Medicago truncatula* et *Verticillium alfalfae*, il existe une évolution permanente entre la plante hôte et les pathogènes. Ces derniers tentent de surmonter les défenses de l'hôte alors que les plantes tentent de contenir l'attaque du pathogène (He *et al.*, 2016). Pour cela, les plantes possèdent trois stratégies afin de s'adapter aux stress biotiques : la migration, la plasticité phénotypique et la micro-évolution.

La migration des plantes lors de l'émergence d'une nouvelle maladie est conditionnée à la virulence du pathogène, une attaque importante et rapide peut empêcher les plantes de migrer (Fisher *et al.*, 2012). Cette migration peut avoir lieu de façon lente en colonisant le milieu naturel de proche en proche ou de façon plus rapide, par saut longue distance (par exemple par transport de graines par des animaux). Dans ces deux cas, le processus de migration est composé de quatre étapes : la fécondité (production de descendants), la dispersion, l'établissement (germination et survie de la plantule) et la croissance jusqu'à maturité et reproduction. La disparition d'une espèce d'un milieu lorsqu'elle ne migre pas assez rapidement est appelée conversion *in situ*. L'espèce qui disparaît est remplacée par l'espèce locale sous-dominante et résistante au pathogène (Neilson *et al.*, 2005).

La plasticité phénotypique correspond à la gamme de phénotypes (aussi appelée norme de réaction) qu'un unique génotype peut exprimer en fonction de son environnement (par exemple augmentation des températures ou encore présence de pathogènes) (Ghalambor *et al.*, 2007; Nicotra *et al.*, 2010; Palacio-López *et al.*, 2015). Ce phénomène est particulièrement important pour les organismes immobiles tels que les plantes afin de pouvoir s'adapter aux hétérogénéités spatiales et temporelles de l'environnement (Zhang *et al.*, 2013c). L'implication de la plasticité phénotypique dans le processus d'adaptation d'une espèce aux changements environnementaux peut être catégorisée en cinq cas différents (**Figure A-5**). Prenons le cas deux populations 1 et 2 respectivement originaires des environnements A et B, lorsqu'il existe une plasticité adaptative, il existe une différence de phénotypes entre les deux environnements pour la population 1 et les phénotypes moyens des populations 1 et 2 dans l'environnement B sont identiques (**Figure A-5-(3)**). Lorsque cette plasticité adaptative n'est pas parfaite, il existe une différence de phénotypes entre les deux environnements pour la population 1 et le phénotype moyen de la population 1 dans l'environnement B est meilleur que celui de la population 2 (**Figure A-5-(4)**) (Ghalambor *et al.*, 2007; Palacio-López *et al.*, 2015).

Différents mécanismes moléculaires sont à l'origine de la plasticité phénotypique comme les mécanismes épigénétiques (ensemble des modifications chromosomiques ayant le potentiel de modifier l'expression des gènes durant le développement d'un organisme telles que la méthylation des cytosines, l'acétylation des histones, ou encore les micro-ARNs (Diez *et al.*, 2014)) ou des modifications transcriptionnelles ou post-transcriptionnelles (Nicotra *et al.*, 2010; Gallusci *et al.*, 2017).

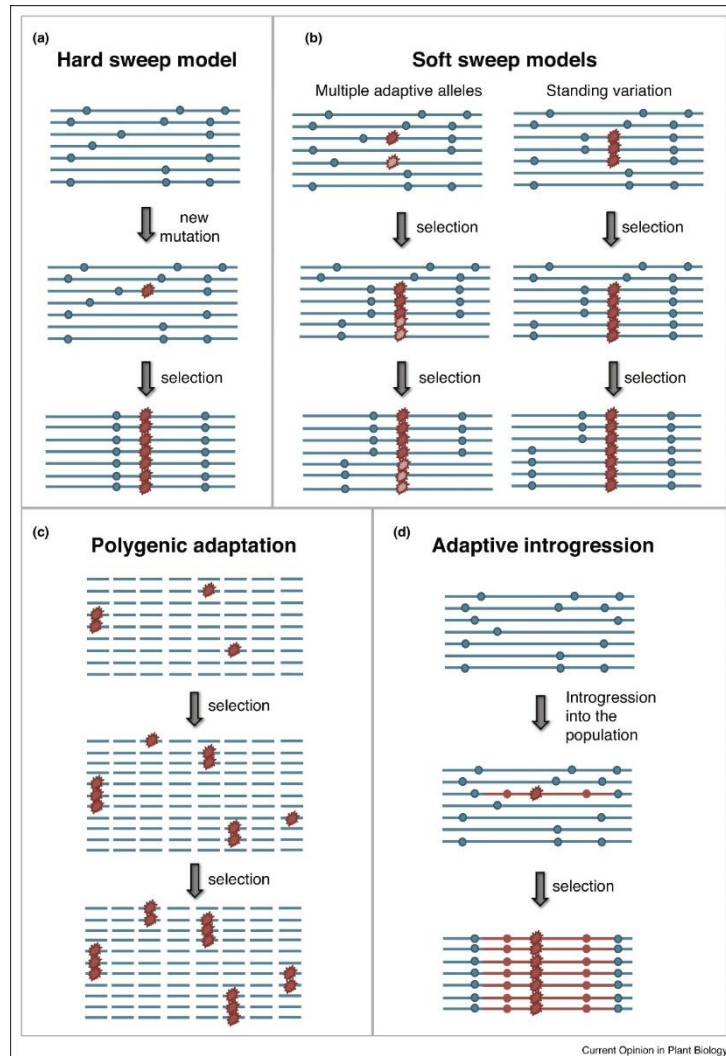


Figure A-6 : Modèles d'adaptation par micro-évolution (extrait de Flood and Hancock, 2017).

Les flèches représentent les modifications de séquences ayant lieu à différents loci au cours du temps, dues à une sélection positive d'un variant adapté (en rouge).

(a). D'après le modèle « hard sweep », un nouveau variant apparaît dans une population et sa fréquence allélique augmente rapidement au sein de la population.

(b). Le modèle « soft sweep » est soit caractérisé par l'apparition simultanée d'un même variant au sein de la population (standing variation) ou par l'apparition de plusieurs variants conférant un avantage adaptatif dans la même région génétique (multiple adaptive model).

(c). L'adaptation polygénique apparaît lorsque différents variants à travers le génome conférant un avantage adaptatif contribuent à l'adaptation d'un trait.

(d). L'introgression adaptative est présente lorsqu'un nouveau variant provenant d'une espèce apparentée ou d'une population lointaine apparaît par croisement dans la population étudiée.

Jusqu'au début des années 1980, la plasticité phénotypique due à des modifications environnementales était considérée comme une nuisance à l'identification du contrôle génétique des phénotypes. Depuis les années 2000, elle est devenue une part intégrale de la compréhension du développement des organismes et de leur interaction avec l'environnement (Pigliucci, 2005). Dans certains cas, cette plasticité phénotypique est héritable (Nicotra *et al.*, 2010). Cette hérédité a par exemple été mise en évidence chez *Arabidopsis thaliana* et *Solanum lycopersicum* dans la résistance aux chenilles (respectivement *Pieris rapae* et *Helicoverpa zea*). En effet, une réduction de taille de 40 à 50% a été observée sur des chenilles se nourrissant de la descendance de plantes qui avaient subi une attaque de chenilles par rapport à celles se nourrissant de la descendance de plantes contrôles. Cette résistance transgénérationnelle est conservée sur deux générations chez *Arabidopsis thaliana*. De plus, cette résistance n'est pas transgénérationnelle chez des mutants d'*Arabidopsis thaliana* dans la voie de biosynthèse des ARN interférents (dicer-like2, dicer-like3, dicer-like4, ARN polymérase nucléaire d2a et d2b). Ceci a permis de mettre en évidence l'implication de mécanismes épigénétiques (ARN interférents) dans cette résistance transgénérationnelle (Rasman *et al.*, 2012).

La micro-évolution est une modification des fréquences alléliques d'un gène conférant un avantage adaptatif au sein d'une population. En effet, les populations naturelles sont exposées à différents types de pression de sélection telles que le climat, la composition du sol ou encore les pressions de sélection d'origine anthropique comme la sélection d'un trait phénotypique d'intérêt agronomique (Flood and Hancock, 2017). Différents modèles sont utilisés pour expliquer le processus d'adaptation des plantes par micro-évolutions aux stress biotiques et abiotiques. Le modèle prédominant est celui du « hard sweep » : un nouveau variant apparaît dans la population, et sa fréquence allélique dans la population augmente rapidement, balayant ainsi l'ancien allèle dans cette population (**Figure A-6-(a)**). Le modèle du « soft sweep » est une variante du premier modèle, où plusieurs haplotypes portant des variants adaptatifs avantageux apparaissent en même temps et remplacent peu à peu les anciens variants (**Figure A-6-(b)**). Ces deux premiers modèles sont caractéristiques de traits contrôlés par un unique gène. Par exemple, l'apparition d'un gène codant une protéine de résistance R chez une plante reconnaissant un effecteur Avr d'un pathogène va conférer la résistance au pathogène (Jones and Dangl, 2006). En ce qui concerne les traits possédant un contrôle polygénique, la puissance de sélection d'un trait phénotypique est dépendante de multiples variants à travers le génome qui existaient avant la pression de sélection (**Figure A-6-(c)**). Ce mécanisme est caractéristique de l'adaptation aux maladies quantitatives alors que les modèles « hard sweep » et « soft sweep » sont typiques des maladies qualitatives. La dernière source d'adaptation des plantes concerne l'introgession de nouveaux fragments de génome par reproduction entre différentes espèces apparentées, dont l'une d'elles possède un avantage adaptatif (**Figure A-6-(d)**) (Flood and Hancock, 2017).

Dans le cadre de cette thèse, la contribution de la micro-évolution dans le processus adaptatif de *Medicago truncatula* vis-à-vis de *Verticillium alfalfae* peut être étudiée car pathogène et plante sont naturellement présents sur les pourtours du bassin méditerranéen.

3. Les pathogènes vasculaires

Les pathogènes vasculaires comprennent des bactéries (telles que les genres *Clavibacter*, *Curtobacterium*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Ralstonia*, *Xanthomonas* et *Xylella*), des champignons (comme les genres *Ceratocystis*, *Fusarium*, *Ophiostoma* et *Verticillium*) et des oomycètes (par exemple les genres *Pythium* et *Aphanomyces*). Ils font partie des phytopathogènes les plus destructeurs, allant jusqu'à la destruction complète des cultures. Les maladies de flétrissement vasculaire affectent les cultures annuelles (colza) comme les cultures pérennes (cerisier), impactant ainsi la production agricole mondiale mais également les écosystèmes naturels. La plupart des symptômes associés à ces maladies se développent généralement de façon acropète, des racines aux sommets des parties aériennes. Malgré ce nom, les plantes infectées ne présentent pas toujours de symptômes de flétrissement (Yadeta and Thomma, 2013). L'âge, la fitness, le statut nutritionnel de l'hôte, les conditions environnementales et la virulence de l'agent pathogène conditionnent la vitesse et la sévérité du développement des symptômes (Hayward, 1991; Roncero *et al.*, 2003; Niño-Liu *et al.*, 2006; Chatterjee *et al.*, 2008).

Les pathogènes vasculaires ont différentes stratégies afin de survivre à l'hiver, ils le passent dans le sol, sur des débris végétaux, dans les cours d'eau ou dans des insectes. La plupart des pathogènes vasculaires étant telluriques, ils pénètrent dans leurs hôtes par les racines, par des blessures ou au point de jonction des racines latérales (Vicente *et al.*, 2001; Di Pietro *et al.*, 2003; Fradin and Thomma, 2006; Klosterman *et al.*, 2009; Michielse and Rep, 2009; Genin, 2010). Néanmoins, d'autres peuvent entrer via les feuilles par les stomates ou les hydathodes comme la bactérie *Xanthomonas oryzae* (Niño-Liu *et al.*, 2006) ou encore être directement injectés dans le xylème via leurs insectes vecteurs qui se nourrissent de la sève brute comme la bactérie *Xylella fastidiosa* transmise par les cicadelles (Chatterjee *et al.*, 2008). Une fois arrivé dans la plante hôte, la stratégie de ces pathogènes est identique : coloniser les vaisseaux du xylème et proliférer (Yadeta and Thomma, 2013).

La sève brute transportée par le xylème étant un milieu nutritif pauvre. Lorsque les pathogènes vasculaires atteignent le xylème, ils acquièrent les nutriments dont ils ont besoin par différentes stratégies. Ils peuvent prélever la petite quantité d'éléments nutritifs qui circulent dans ces vaisseaux conducteurs, digérer grâce à des enzymes les parois cellulaires de l'hôte, envahir les cellules avoisinantes ou capter les ressources de l'hôte (Divon *et al.*, 2006; Möbius and Hertweck, 2009; Klosterman *et al.*, 2011). Selon une hypothèse, les pathogènes vasculaires utiliseraient le xylème comme milieu de vie afin d'éviter toute compétition avec les autres pathogènes (McCully, 2001).

Des traitements phytosanitaires préventifs afin d'éliminer les vecteurs des pathogènes vasculaires non telluriques permettent d'éviter la contamination des cultures. Par exemple, la graphiose de l'orme est

causée par le pathogène *Ophiostoma novo-ulmi*. Ce champignon a notamment pour vecteurs *Scolytus scolytus* et *Scolytus multistriatus* (Harwood *et al.*, 2011). *Colopterus truncatus*, *Colopterus niger*, et *Colopterus semitectus* sont des vecteurs de *Ceratocystis fagacearum*, agent pathogène responsable de la maladie du flétrissement du chêne (Hayslett *et al.*, 2008). Les pathogènes vasculaires telluriques tels que *Verticillium* ou *Ralstonia* sont beaucoup plus compliqués à éradiquer : la fumigation des sols ou la solarisation sont de moins en moins utilisées car ces méthodes sont soit très polluantes, soit difficiles à mettre en œuvre. De plus, lorsque l'agent pathogène pénètre dans la plante, il est alors protégé par les tissus végétaux. La stratégie la plus efficace reste alors la sélection variétale de cultivars résistants à ces pathogènes (Yadeta and Thomma, 2013).

Tableau A-2 : Production annuelle et pertes économiques et de rendement causées par la verticilliose chez ses principaux hôtes à intérêt agronomique (extrait de FAO, 2013).

Plante hôte	Production annuelle globale (moyenne 2005-2010)		Perte estimée		Perte maximale
	Millions de Tonnes	Millions de \$	Millions de Tonnes	Millions de \$	Pourcentage
Tomate	140,95	71,07	1,41	710,72	70
Pommes de terre	326,02	70,7	3,26	707,03	50
Coton	23,52	35,47	0,24	354,72	30
Colza	54,98	20,65	0,55	206,53	50
Pastèque	95,62	21,16	0,96	211,61	-
Olivier	17,7	21,05	0,18	210,46	75
Piments et poivrons	27,65	17,88	0,28	178,77	20
Concombre	55,53	17,26	0,56	172,6	-
Choux	64,66	16,89	0,65	168,93	-
Laitue	23,56	13,95	0,24	139,47	100
Tabac	6,69	12,48	0,07	124,78	30
Aubergine	38,32	12,22	0,38	122,15	70
Tournesol	31,7	10,33	0,32	103,3	55
Fraise	4,14	8,75	0,04	87,48	-
Epinards	17,16	6,41	0,17	64,1	-
Chou-fleur (et brocoli)	18,56	6,39	0,19	63,93	-
Pistachier	0,73	3,26	0,01	32,62	-
Avocat	3,73	3,01	0,04	30,08	-
Lentilles	3,07	1,96	0,04	19,61	-
Artichaut	1,44	1,15	0,01	11,45	-
Houblon	0,13	586	0	5,86	100
Luzerne	436	-	-	-	80

4. *Verticillium* sp. : l'agent causal de la verticilliose

Le genre *Verticillium* comprend dix espèces d'ascomycètes phytopathogènes causant la verticilliose. Parmi ces espèces, *V. dahliae*, *V. albo-atrum*, *V. alfalfae*, *V. longisporum*, *V. nonalfalfae*, *V. tricorpus*, *V. zaregamsianum* causent des pertes de rendement significatives (**Tableau A-2**) alors que *V. nubilum*, *V. klebahnii*, *V. isaacii* provoquent des pertes de rendements moins importantes (Inderbitzin *et al.*, 2013). Les espèces *V. dahliae* et *V. albo-atrum* possèdent à elles seules un spectre d'hôte de plus de 200 espèces végétales, principalement des dicotylédones. Ces deux espèces causent des dégâts principalement dans les zones tempérées, moins fréquemment dans les zones subtropicales, mais sont relativement peu présentes dans les zones tropicales. L'espèce *V. alfalfae* a pour principal hôte les médocs (Fradin and Thomma, 2006; Inderbitzin and Subbarao, 2014).

Avec le développement des outils moléculaires, la taxonomie de cette espèce a récemment évolué et n'est plus uniquement basée sur des critères morphologiques et notamment sur les structures de survie telles que les chlamydospores, les microscélotes ou le mycélium en dormance (**Figure A-7**). En effet, la première espèce de *Verticillium* isolée en 1816 par Nees von Esenbeck était incluse dans un groupe taxonomique regroupant les espèces possédant un conidiophore composé de spores en forme de bouteille, assemblées en verticilles et rattachées le long d'un axe principal (Nees von Esenbeck, 1816). Il regroupait alors des espèces apparentées distantes telles que les *Lecanicillium* (contenant insectes et champignons pathogènes), les *Pochonia* et les *Haptocillium* (comprenant des nématodes parasites), ou encore les *Gibellulopsis* et les *Musicillium* (contenant des phytopathogènes) (Inderbitzin *et al.*, 2011). Actuellement, deux clades regroupant les dix espèces de *Verticillium* ont été déterminés en utilisant les données des régions ITS (ribosomal internal transcribed spacer region), des séquences partielles des protéines actine (ACT), du facteur d'élongation 1-alfa (EF), de la glyceraldéhyde-3-phosphate (GDP) et de la tryptophane synthase (TS) obtenues sur 74 isolats différents de *Verticillium*. Morphologiquement, ces deux groupes Flavexudans et Flavonexudans correspondent respectivement à la production ou non de pigments jaunes au niveau des hyphes (Inderbitzin *et al.*, 2011). Une étude plus large en utilisant les séquences ITS de 574 isolats différents de *Verticillium* met également en évidence ces deux clades (**Figure A-8**, Inderbitzin and Subbarao, 2014).

Les symptômes causés par *Verticillium* peuvent varier en fonction de l'hôte et de l'espèce du champignon pathogène, il n'y a donc pas de symptômes caractéristiques à toutes les plantes infectées par le champignon. Ainsi chez la tomate, une infection par *Verticillium dahliae* va se caractériser par des flétrissements et des chloroses d'une moitié de feuille alors qu'une inoculation par *Verticillium albo-atrum* se caractérise par l'apparition de nécroses foliaires en forme de « V ». Chez *Arabidopsis*

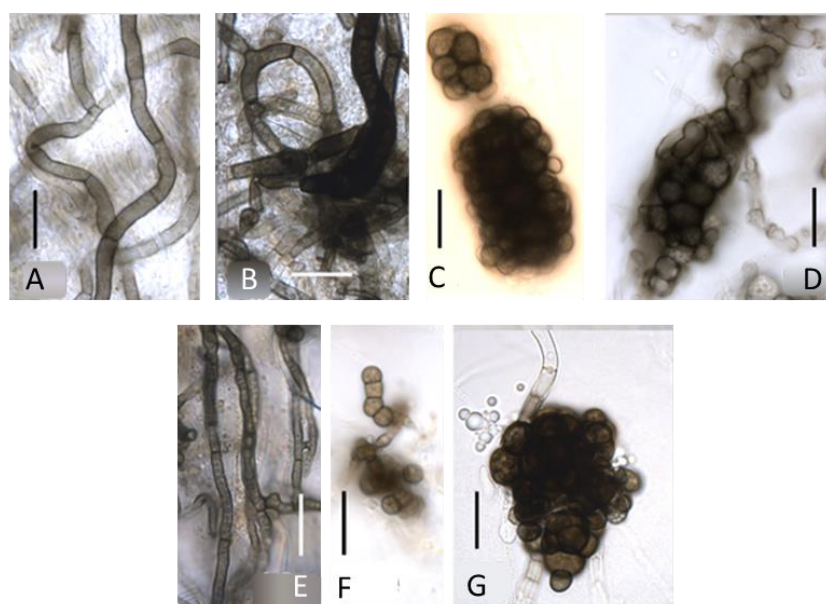


Figure A-7 : Structures de survie des principales espèces pathogènes de *Verticillium* (extrait de Inderbitzin *et al.*, 2011).

L'ensemble des structures ont été observées sur milieu agar-eau supplémenté avec des tiges d'herbacées de la famille des Astéracées et des Malvacées (WA-p). La barre d'échelle représente 20µm. A. Mycélium dormant de *Verticillium albo-atrum* PD747 après 33 jours de culture. B. Mycélium dormant de *Verticillium alfalfae* PD489 après 30 jours de culture. C. Microsclérote de *Verticillium dahliae* PD322 après 12 jours de culture. D. Microsclérote allongée de *Verticillium longisporum* PD356 après 35 jours de culture. E. Mycélium dormant de *Verticillium nonalfalfae* PD747 après 18 jours de culture. F. Chaîne de chlamydospores et microsclérotés de *Verticillium tricorpus* PD685 après 38 jours de culture. G. Microsclérote de *Verticillium zaregamsianum* PD586 après 31 jours de culture.

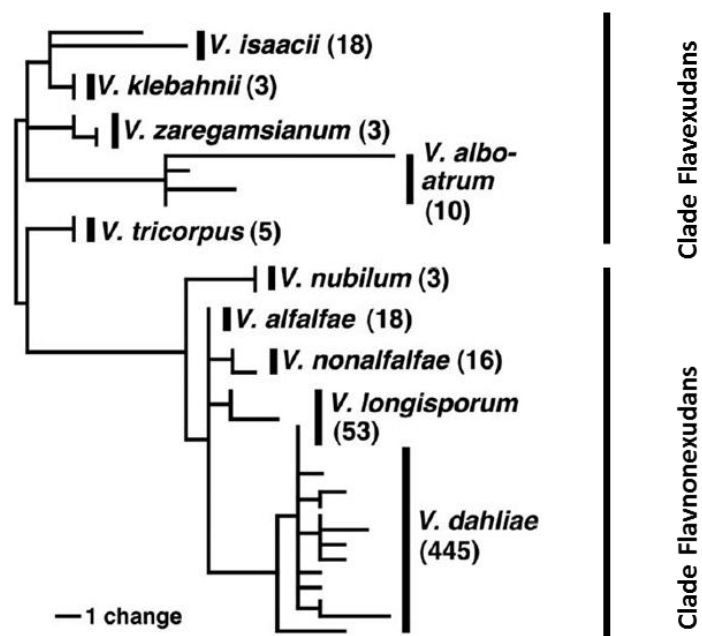


Figure A-8 : Relation phylogénétique entre les dix espèces de *Verticillium* (adapté de Inderbitzin and Subbarao, 2014).

Cet arbre a été construit en utilisant les données des régions ITS de 574 isolats de *Verticillium* disponibles sur GenBank.

Le nombre d'isolats par espèce est précisé entre parenthèses.

thaliana, l'apparition de chlorose sur les feuilles constituant la rosette et une sénescence précoce sont caractéristiques d'une infection par *Verticillium dahliae* (**Figure A-9**, Fradin and Thomma, 2006).

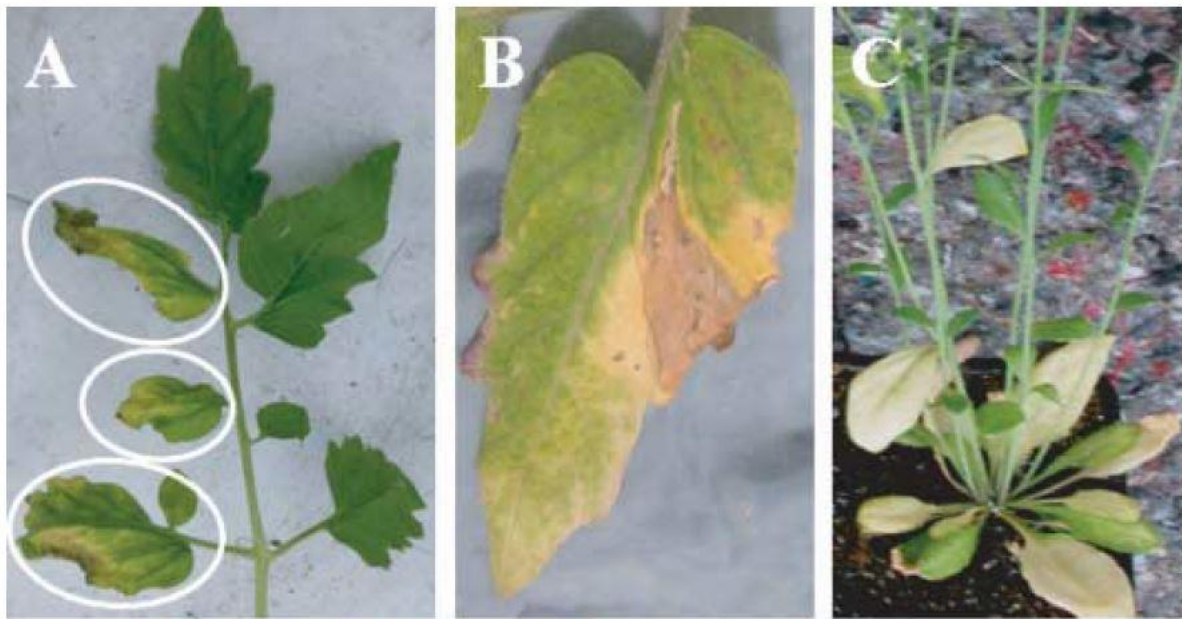


Figure A-9 : Symptômes foliaires de *Verticillium* sp. sur différentes plantes hôtes (extrait de Fradin and Thomma, 2006).

A. Chloroses localisées sur la moitié d'une feuille de tomate après inoculation par *V. dahliae*. B. Nécrose caractéristique en forme de V sur feuille de tomate inoculée par *V. albo-atrum*. C. Chloroses et sénescence précoce chez *Arabidopsis thaliana* après inoculation par *V. dahliae*.

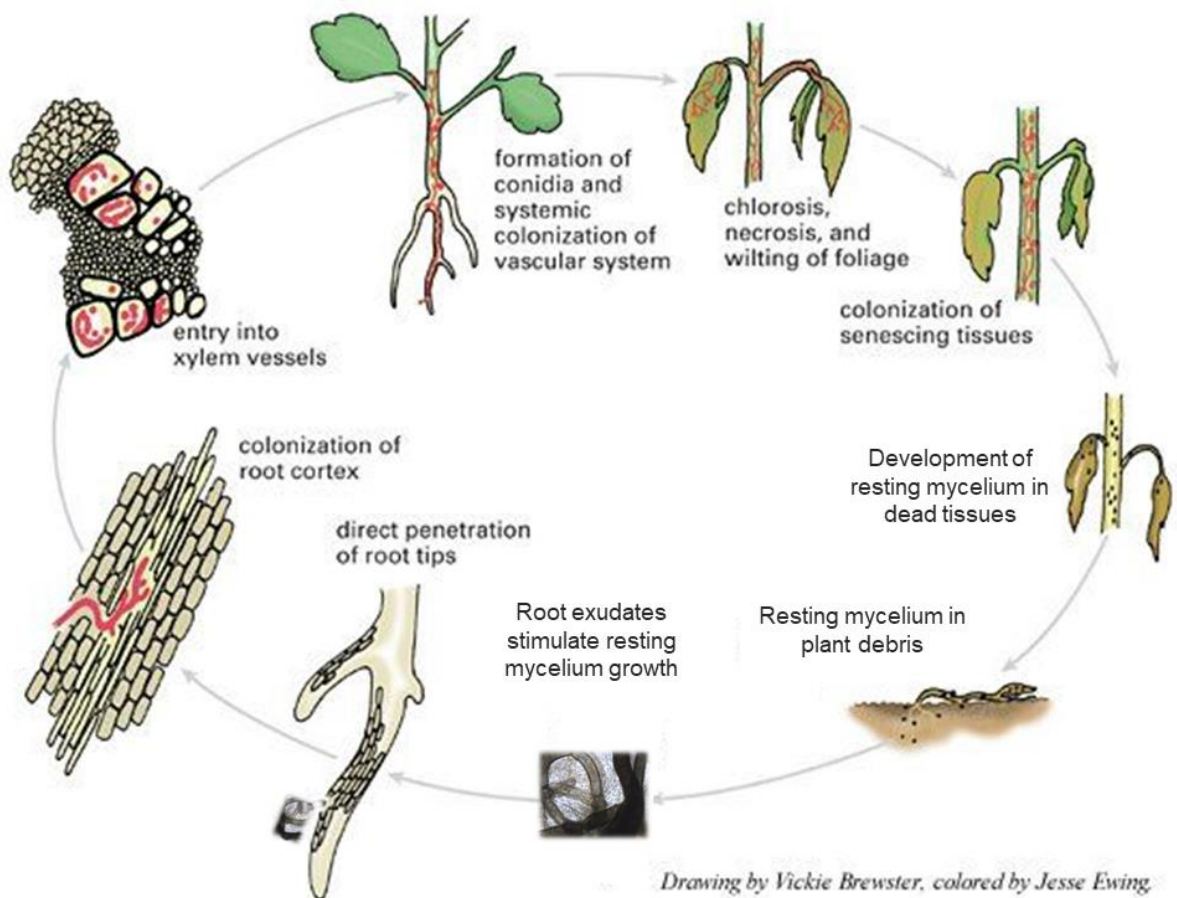


Figure A-10 : Cycle de maladie de *Verticillium alfalfae* (adapté de Berlangier and Powelson, 2000; Inderbitzin *et al.*, 2011).

a. Cycle de la maladie, transmission et dispersion

Le cycle de la maladie est commun aux différentes espèces de *Verticillium* et peut être découpé en trois phases: la phase de dormance, la phase parasitique et la phase saprophyte (**Figure A-10**, Jiménez Díaz and Millar, 1988). Pendant la phase de dormance, *Verticillium* se trouve dans le sol sur des débris végétaux sous différentes formes de structures de dormance. Ces structures permettent la survie du pathogène pendant plusieurs années en attendant les conditions favorables à une nouvelle infection : de 10 à 15 ans pour les microscélérotés de *V. dahliae*, d'un à cinq ans pour le mycélium mélanisé de *V. albo-atrum* (Wilhelm, 1955; Sewell and Wilson, 1966). Cette phase s'achève lorsque les structures de dormance détectent dans la rhizosphère une présence accrue de carbone et d'azote provenant d'exsudats racinaires des plantes hôtes et non-hôtes. Cela provoque une germination du champignon. Certaines structures de dormance comme les microscélérotés de *V. dahliae* ont la capacité de germer plusieurs fois car une unique cellule se développe après détection de ces exsudats maximisant ainsi les chances d'infection. Il a été estimé que les hyphes peuvent croître sur une distance allant jusqu'à 300µm afin d'atteindre les racines des plantes (Huisman, 1982).

La phase parasitique débute par la pénétration des hyphes dans les racines. Cette pénétration est effectuée directement au niveau des cellules épidermiques de l'extrémité des racines ou des zones d'insertion des racines secondaires chez *V. dahliae* et *V. longisporum*, et est facilitée par la présence de blessures. Chez *V. alfalfae*, la présence de blessure est obligatoire afin que l'hyphe pénètre dans la racine. Ces zones sont les plus propices à la colonisation car pour atteindre le système vasculaire, le champignon doit traverser l'endoderme, véritable barrière physique à la pénétration des hyphes (les cellules endodermiques possèdent des parois subérisées), or cette barrière est absente ou endommagée au niveau de ces zones. Les hyphes vont ensuite coloniser le cortex racinaire jusqu'à atteindre les vaisseaux du xylème. Puis, la colonisation systémique de la plante est assurée par la production de spores qui sont véhiculées par les vaisseaux conducteurs: le xylème est un milieu de vie trop pauvre et la croissance du pathogène y est plus limitée. La **Figure A-11** illustre ce processus de colonisation chez *Medicago truncatula* par une souche GFP de *Verticillium alfalfae* (Ben et al., 2013a). Le développement de l'agent pathogène au sein des vaisseaux du xylème provoque l'arrêt du flux de sève brute dans la plante et peut causer des symptômes de flétrissement voire la mort de la plante pour les hôtes les plus sensibles. La sécrétion de toxines par le pathogène est une autre hypothèse pouvant expliquer les symptômes de cette maladie (Fradin and Thomma, 2006).

Après la phase parasitique, la phase saprophyte consiste en une colonisation de tous les tissus de la plante sénescence lorsqu'elle est sensible et par la mise en place des structures de dormance. Après la mort de la plante, une nouvelle phase de dormance débute.

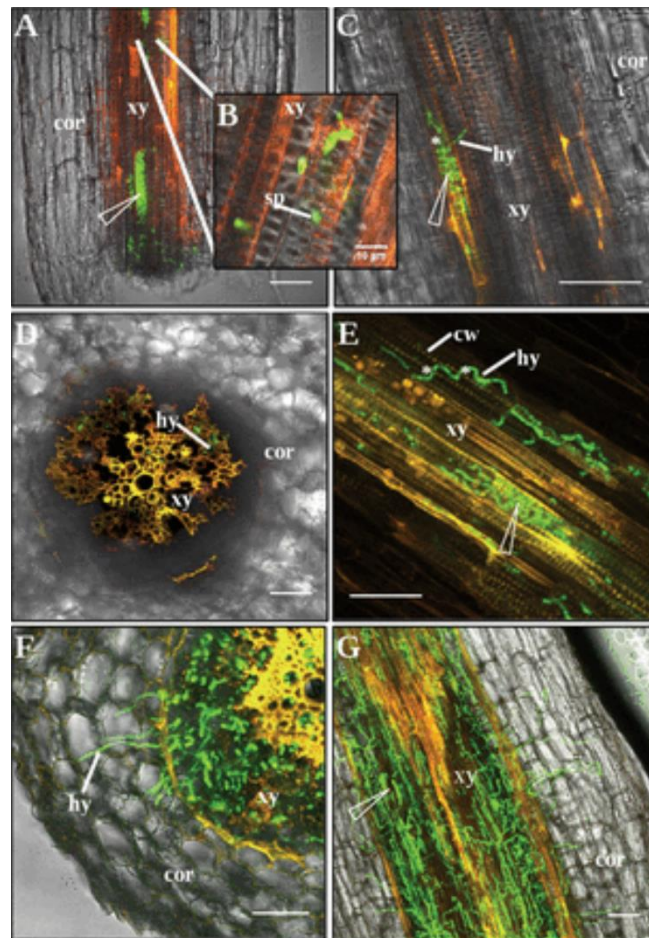


Figure A-11 : Colonisation racinaire de l'accession sensible F83005.5 de *Medicago truncatula* par une souche GFP de *Verticillium alfalfae* observée par microscopie confocale à balayage laser (extrait de Ben *et al.*, 2013a).

A : Deux heures après inoculation, les conidies se trouvent dans les vaisseaux du xylème et s'accumulent au niveau des trachéides (flèche).

B : Zoom sur des conidies possédant des hyphes en germination traversant la plaque à l'extrémité des vaisseaux du xylème.

C : Vingt-quatre heures après inoculation, conidies germées et hyphes.

D : Sept jours après inoculation, hyphes dans le cylindre central, absence d'hyphes dans le cortex.

E : Sept jours après inoculation, prolifération du mycélium dans les vaisseaux du xylème et pénétration dans les cellules adjacentes (astérisque).

F et G : Vingt-et-un jours après inoculation, prolifération du mycélium dans les tissus vasculaires (F) et corticaux (G).

Bars = 50 μ m, et 10 μ m en B. Sections longitudinales en A, B, C, E, G; Sections transversales en D et F. cor = cortex; cw = paroi cellulaire; hy = hyphe; sp = conidie; xy = éléments du xylème.

V. dahliae se caractérise par un unique cycle de maladie par an (maladie monocyclique) alors que *V. albo-atrum* peut produire des conidies sur les tissus infectés qui peuvent être dispersées par le vent et contribuer à la propagation de la maladie (maladie polycyclique). Cette observation ayant été réalisée dans des champs de luzerne avant la mise en place de la nouvelle taxonomie, on peut émettre l'hypothèse qu'il s'agissait peut-être de souches de *V. alfalfae* (Klosterman *et al.*, 2009).

La dispersion de l'agent pathogène est principalement causée par les résidus de cultures contaminés, des outils non désinfectés et parfois par des semences contaminées telles que les semences de laitue ou de luzerne (Isaac and Heale, 1961; Vallad *et al.*, 2005).

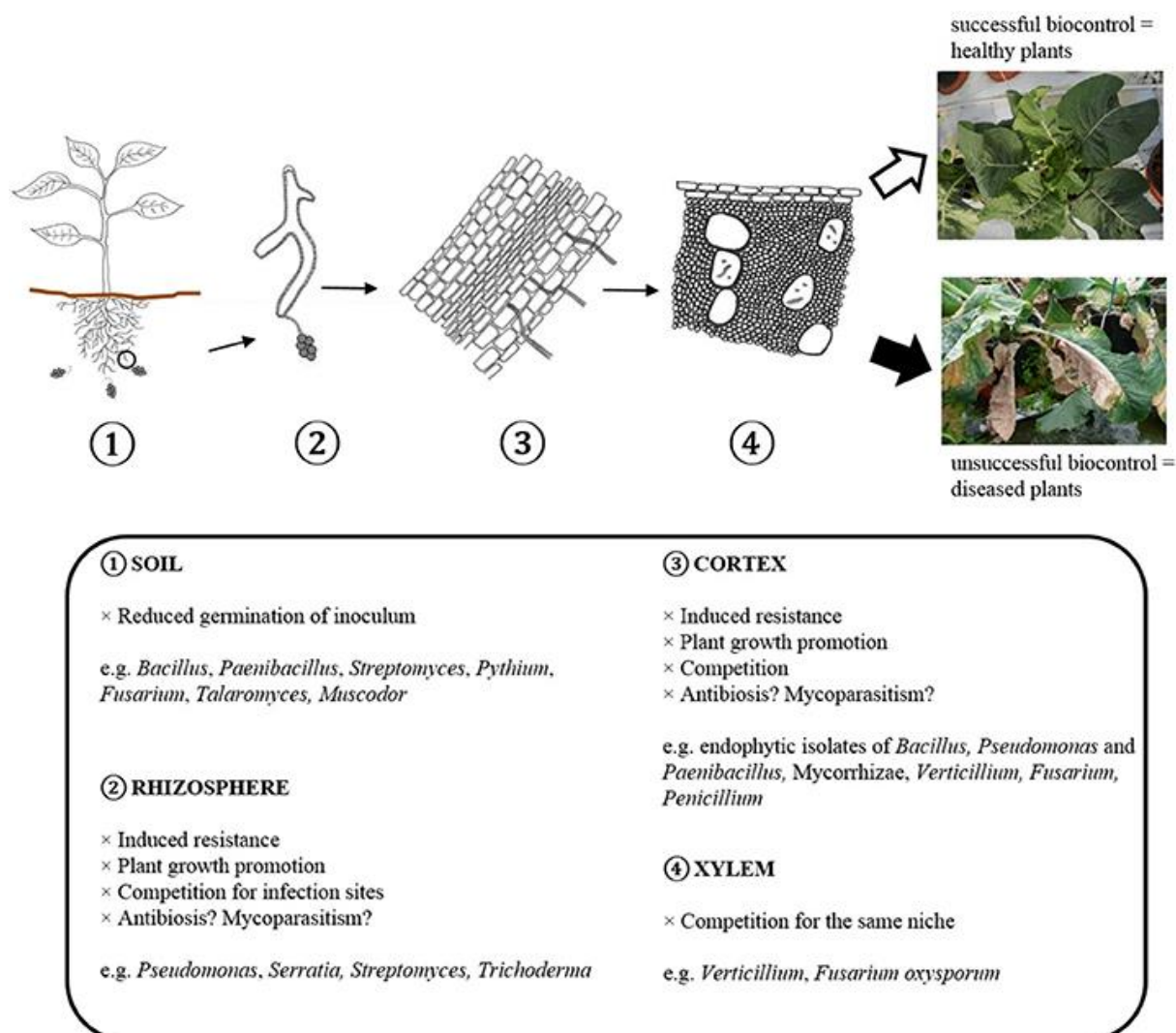


Figure A-12 : Illustration des différentes étapes où des agents de biocontrôle peuvent interférer dans le cycle de vie de *Verticillium* (extrait de Deketelaere *et al.*, 2017).

- (1). Dans le sol, les agents de biocontrôle peuvent affecter la survie ou la germination de l'inoculum.
- (2) et (3). Au sein de la rhizosphère et du cortex, les BCAs peuvent induire la résistance des plantes, promouvoir la croissance végétale, entrer en compétition avec le pathogène au niveau des sites d'infections, provoquer des effets d'antagonisme (antibiose ou mycoparasitisme).
- (4). Dans le xylème, les BCAs entrent en compétition avec *Verticillium* pour la même niche.

b. Moyens de lutte contre la verticilliose

De par son accessibilité restreinte (dans le sol ou la plante), les moyens de lutte contre *Verticillium* sp. restent limités. Ainsi, en France, il n'existe pas de produits phytosanitaires homologués capables de le détruire. Néanmoins, dans d'autres pays tels que les Etats-Unis et plus précisément en Californie, la fumigation des sols par bromométhane est utilisée. Cette méthode bien que dévastatrice pour la faune et la flore du sol est efficace. Des méthodes physiques (augmentation de la température, solarisation) peuvent être utilisées, mais leur mise en pratique peut s'avérer difficile (Inderbitzin and Subbarao, 2014).

Lorsque les méthodes chimiques ou physiques ne sont pas envisageables, une lutte prophylactique doit être mise en place. Elle regroupe l'ensemble des pratiques agricoles limitant l'impact de la verticilliose. Il s'agit tout d'abord de limiter la quantité d'inoculum primaire et d'éviter la propagation de matériel végétal contaminé. Des mesures de quarantaine peuvent être mises en place pour ces cas précis et le matériel utilisé dans des champs infectés doit être désinfecté. Des rotations de cultures sont également conseillées, mais il faut néanmoins veiller à vérifier que la nouvelle culture implantée ne soit pas un hôte de *Verticillium* et avoir une idée des différentes espèces pathogènes présentes au champ (Klosterman *et al.*, 2009). Par exemple, une rotation de culture suivie d'une incorporation des résidus de culture incluant du brocoli (culture colonisée par *Verticillium dahliae* mais ne présentant pas de symptômes) réduit significativement la sévérité de la verticilliose des cultures suivantes de chou-fleur ou d'aubergine (Shetty *et al.*, 2000; Ikeda *et al.*, 2015). La production de gluconisolates par les brassicacées telles que le brocoli est connue pour assainir le sol. En effet, les gluconisolates ne sont pas des composés toxiques pour les micro-organismes, mais après enfouissement des résidus de cultures dans le sol, ils se décomposent en isothiocyanates, thiocyanates, nitriles et épithionitriles, composés tous toxiques pour ces micro-organismes. Néanmoins, la croissance *in vitro* de *V. dahliae* n'étant pas liée à la présence de ces composés et les choux-fleurs étant très sensibles à *Verticillium*, les auteurs de cette étude ont émis l'hypothèse que les composés antifongiques émis par ces résidus modifieraient la microflore du sol et permettraient l'enrichissement du sol en espèces antagonistes à *Verticillium* (Shetty *et al.*, 2000).

En plus de la prophylactie, des travaux sur le biocontrôle de *Verticillium* ont également été menés. Les différentes caractéristiques recherchées sur les agents de biocontrôle (BCAs, biocontrol agents) afin de protéger les plantes sont leur capacité (i) à affecter la survie ou la germination des microscélotes, (ii) à coloniser le xylème et/ou le cortex et à rentrer en compétition avec *Verticillium* pour les nutriments et/ou l'espace, (iii) à induire une résistance chez la plante et/ou (iv) à promouvoir la croissance végétale (**Figure A-12**, Deketelaere *et al.*, 2017). Par exemple, une application racinaire de *Pseudomonas alvei* K-165, *Arthrobacter* sp. FP15 et de *Blastobotrys* sp. FP12 entraîne une réduction

de germination de *Verticillium dahliae* au sein de la rhizosphère des aubergines (*Solanum melongena*) (Antonopoulos *et al.*, 2008; Papasotiriou *et al.*, 2013). Les champignons mycorhiziens arbusculaires tels que *Glomus mosseae* ou *Glomus intraradices* ont la capacité de promouvoir la croissance des plantes (notamment celle de la tomate (*Solanum lycopersicum*), de l'aubergine et du piment (*Capsicum annuum*)) tout en réduisant la sévérité des symptômes provoqués par *Verticillium dahliae* (Demir *et al.*, 2015). L'utilisation d'espèce non ou peu pathogène de *Verticillium* ou *Fusarium* peut contribuer à la réduction de la sévérité de la maladie chez les plantes en créant une compétition entre champignon vasculaire pour les ressources et/ou l'espace. Par exemple, chez le coton (*Gossypium hirsutum*), la souche CVD-WHw de *Verticillium dahliae* provoque peu de symptômes et permet de réduire la sévérité de la maladie lorsque les plants de coton sont inoculés par cette souche et la souche très pathogénique *Verticillium dahliae* CVD-AYb (Zhu *et al.*, 2013). *Pseudomonas alvei* K-165 et *Fusarium oxysporum* F2 (souche non pathogène) sont des BCAs qui peuvent induire les défences des plantes. En effet, chez l'aubergine, en plus de la réduction de la sévérité des symptômes observée après inoculation par *Verticillium dahliae*, les gènes de pathogénicité *PR1* et *PR4* sont activés en présence de ces microorganismes, et cette induction est corrélée à la présence des BCAs dans la rhizosphère (Angelopoulou *et al.*, 2014). Bien que ces travaux soient prometteurs, à l'heure actuelle aucun de ces microorganismes n'est actuellement commercialisé en tant qu'agent de biocontrôle en Australie, au Brésil, au Canada, aux Etats-Unis, au Japon, en Nouvelle-Zélande ou dans l'Union Européenne (van Lenteren *et al.*, 2018). En effet, des essais en plein champ sont nécessaires (Deketelaere *et al.*, 2017). Toutes ces stratégies peuvent s'avérer peu efficaces et la sélection de variétés génétiquement résistantes reste un des moyens les plus efficaces pour protéger les cultures.

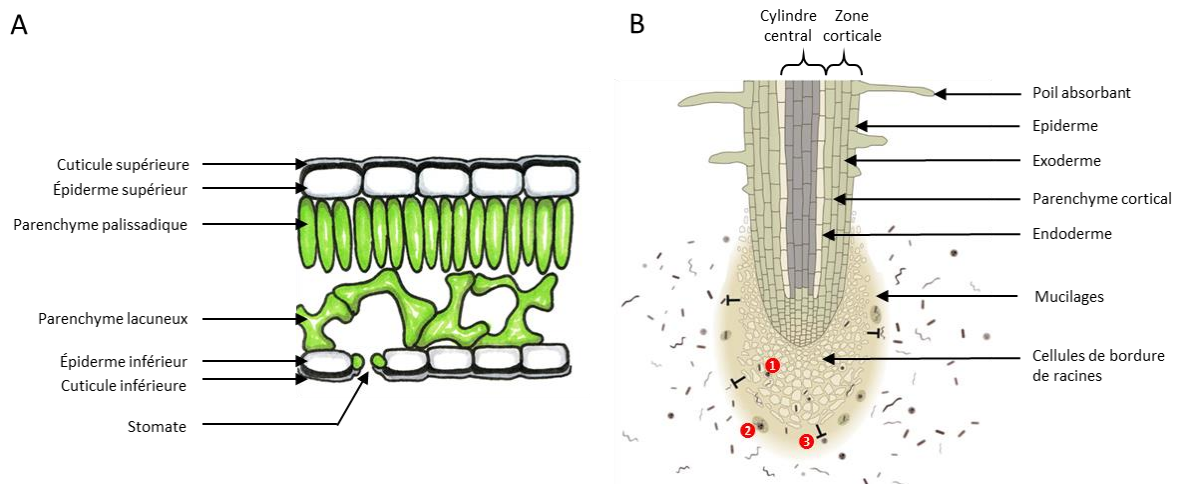


Figure A-13 : Schémas des barrières physiques à l'entrée des pathogènes chez la plante.

A. Coupe transversale d'une feuille de dicotylédone. Les cuticules et les différentes parois cellulaires forment un premier rempart physique à l'entrée des pathogènes. Les stomates peuvent être une voie d'entrée naturelle pour les pathogènes (adapté de Freeman, 2008).

B. Coupe longitudinale d'un apex racinaire. Les micro-organismes représentés sont des champignons, des oomycètes, des bactéries, des virus, des nématodes, et des arthropodes. 1 : les pathogènes sont attirés et pénètrent dans des cellules de bordure de racines physiologiquement indépendantes de l'apex racinaire pour éviter une infection de la racine. 2 : Les mucilages (polysaccharides, protéines, ADN extracellulaire) sécrétés par les cellules de bordure de racines forment une matrice qui immobilise et agrège les pathogènes entre eux. 3 : Inhibition ou extermination des micro-organismes grâce aux composés sécrétés par les cellules de bordures de racines possédant des propriétés anti-microbiennes ou anti-fongiques (adapté de Baetz and Martinoia, 2014).

II. Bases moléculaires de la résistance aux pathogènes chez les plantes

Tant que les résistances de la plante hôte ne sont pas contournées, l'utilisation de variétés végétales résistantes aux pathogènes permet de réduire la croissance du pathogène. Il ne cause que des dommages modérés à l'hôte et l'utilisation de pesticides n'est pas nécessaire. La plante possède plusieurs couches de résistance afin de contenir l'infection des pathogènes : des défenses préformées, et des défenses induites consistant en une perception du non soi, une transduction du signal et une mise en place des défenses (Gururani *et al.*, 2012).

1. Défenses préformées et induites aux pathogènes

Il existe des barrières physico-chimiques à la pénétration de tout agent pathogène au sein des plantes, elles sont parmi les plus importantes composantes des résistances préformées. Les premières barrières physiques que rencontrent les pathogènes foliaires sont la cire, la cuticule, l'épiderme, et les parois cellulaires, elles sont présentes chez toutes les espèces végétales (Senthil-Kumar and Mysore, 2013, **Figure A-13-A**). Pour se protéger des pathogènes racinaires, les racines disposent d'autres barrières physiques : l'exoderme et l'endoderme (**Figure A-13-B**). Ces deux couches peuvent être encerclées par des cadres de Caspari, couches hydrophobes composées principalement de lignine ayant un rôle de contrôle du flux radial de l'eau et des ions à travers les racines et limitant également la pénétration des micro-organismes. De plus, les cellules de l'endoderme peuvent également contenir de la subérine et des alcools pouvant prévenir de l'invasion des pathogènes (De Coninck *et al.*, 2015). Par exemple, un contenu plus important en subérine des cellules endodermiques chez le soja (*Glycine max*) réduit la sensibilité à *Phytophthora sojae* (Ranathunge *et al.*, 2008).

Les barrières chimiques que rencontrent les pathogènes sont les composés anti-microbiens produits par la plante. Ces métabolites secondaires constituent deux classes, les phytoanticipines (présentes constitutivement dans la plante) et les phytoalexines (synthétisées après exposition ou infection par l'agent pathogène) (VanEtten, 1994). Chez le fraisier (*Fragaria ananassa*), la phytoanticipine fragarine inhibe la croissance de plusieurs pathogènes bactériens et fongiques comme *Pseudomonas syringae* pv. *gladiolii* ou encore *Colletotrichum fragariae* (Filippone *et al.*, 1999). Chez les brassicacées, les phytoanticipines glucosinolates réduisent également la croissance de bactéries phytopathogènes telles que *P. syringae* pv. *glycinea* ou *P. syringae* pv. *Phaseolicola* (Mishina and Zeier, 2007). Chez la luzerne (*Medicago sativa*), la phytoalexine médicarpine inhibe notamment la croissance des champignons *Phytophthora megasperma* s.sp. *medicaginis* et *Phoma medicaginis* (Blount *et al.*, 1992).

Les cellules périphériques et la coiffe des racines possèdent à la fois un rôle de barrière physique et chimique dans les défenses basales préformées de la plante (**Figure A-13-B**). En effet, les cellules de la bordure des racines ont la capacité de se détacher lorsqu'une attaque de pathogène est détectée évitant ainsi l'infection de l'apex racinaire et elles peuvent également former des agrégats avec

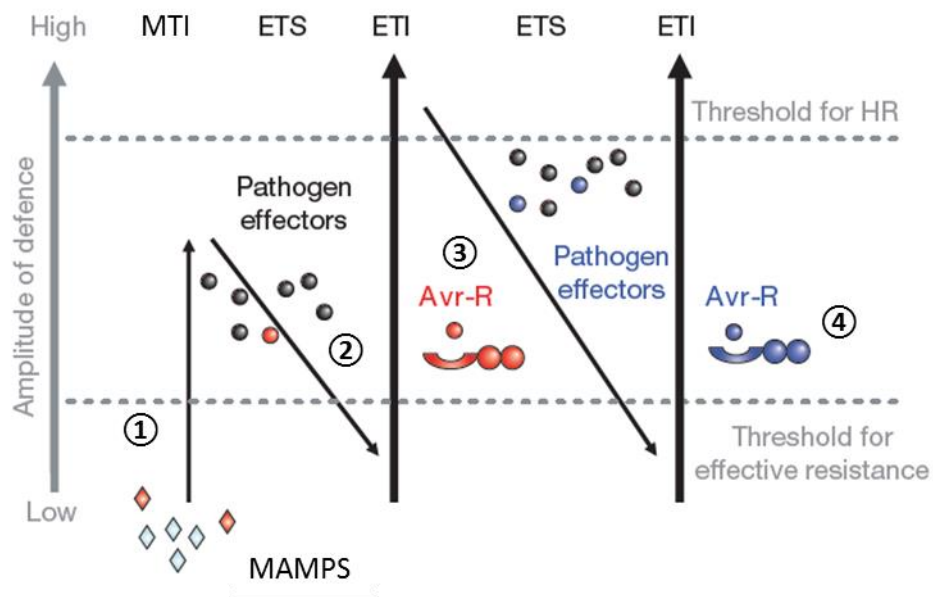


Figure A-14 : Modèle des interactions plante/pathogène en zigzag (extrait de Jones and Dangl, 2006).

En phase 1, la plante détecte les MAMPs (losanges rouges) grâce aux PRRs qui déclenchent la PTI. En phase 2, le pathogène injecte ses effecteurs afin d'interférer avec la PTI ou de favoriser sa nutrition ou sa colonisation, la ETS est déclenchée. En phase 3, un effecteur Avr-R (en rouge) est reconnu par une protéine R, l'ETI est activée, elle peut déclencher une réaction d'hypersensibilité (HR) chez la plante. En phase 4, les isolats qui ont perdu l'effecteur Avr sont sélectionnés et un autre effecteur (en bleu) peut supprimer l'ETI. La sélection naturelle favorise de nouveaux allèles de la protéine R capables de reconnaître les nouveaux effecteurs acquis, provoquant ainsi une nouvelle ETI.

MAMPs : Microbe-Associated Molecular Patterns. MTI : MAMP-triggered immunity. ETS: effector-triggered susceptibility. ETI: effector-triggered immunity. PRRs: Pattern recognition receptors. HR: hypersensitive cell death response. Avr : Avirulence protein.

différents micro-organismes pathogènes. De plus, ces cellules sécrètent des composés anti-microbiens tels que des protéines phénoliques ou encore des arabinogalactanes qui augmentent la résistance des cellules de bordures de racines aux micro-organismes (De Coninck *et al.*, 2015). Par exemple, chez le pois (*Pisum sativum*), des arabinogalactanes inhibent la germination des zoospores d'*Aphanomyces euteiches* et l'inoculation de racines de pois par ce pathogène augmente le détachement des cellules de bordures de racines et la production de la phytoalexine pisatine (Cannesan *et al.*, 2011, 2012).

Lorsque cette première barrière ne peut contenir les attaques des micro-organismes, les plantes mettent en place une défense induite par le pathogène : cette dernière se présente sous deux formes, la MTI (MAMP-Triggered Immunity) et l'ETI (Effector-Triggered Immunity). En 2006, Jones et Dangl ont proposé un modèle d'interaction plante/pathogène en zig-zag. Ce modèle présente la détection des MAMPs par des PRRs (Pattern recognition receptors), des récepteurs membranaires comme première ligne de défense immunitaire des plantes. Puis, certains pathogènes peuvent contourner la MTI en sécrétant des effecteurs et en provoquant une ETS (effector-triggered susceptibility). Par exemple, les bactéries phytopathogènes injectent des effecteurs dans le cytoplasme de l'hôte grâce à leurs mécanismes de sécrétion de type III. Les plantes ont alors évolué en développant des protéines de résistance R cytoplasmique qui reconnaissent ces effecteurs. Ces protéines R sont majoritairement des récepteurs intra-cellulaires qui déclenchent l'ETI. Une des conséquences possibles de l'ETI est la mort cellulaire programmée des cellules infectées, aussi appelée réponse hypersensible (HR), et la résistance systémique acquise (SAR). Cette pression de sélection provoque une évolution des effecteurs des isolats du pathogène (perte, modification de l'effecteur existant et reconnu par la plante hôte ou acquisition de nouveaux effecteurs) afin de supprimer l'ETI. En retour, les récepteurs de la plante évoluent également pour reconnaître les nouveaux effecteurs et déclencher de nouveau une ETI (**Figure A-14**). Ce modèle chronologique est aujourd'hui remis en question car les distinctions entre MAMPs/effecteurs et entre PRRs/protéines R ne peuvent pas toujours être strictement maintenues, il y aurait plutôt un continuum entre MTI et ETI (Thomma *et al.*, 2011).

Tableau A-3 : Exemples de MAMPs/DAMPs et leurs PRRs correspondantes (extrait de Muthamilarasan and Prasad, 2013).

Source	MAMPs/DAMPs	Epitope	PRR	PRR Type	References
Bacteria	Flagellin	flg22	FLS2	LRR-RLK	Gómez-Gómez <i>et al.</i> , 2001
	Cold-shock proteins	RNP-1 motif	unidentified	unidentified	Felix and Boller, 2003
	Xoo derived	unidentified	Xa26	LRR-RLK	Sun <i>et al.</i> , 2004
	Ef-Tu	elf8	EFR	LRR-RLK	Zipfel <i>et al.</i> , 2006
	Peptidoglycan hairpin	HrpZ	unidentified	unidentified	Erbs <i>et al.</i> , 2008
	lipopolysaccharides	unidentified	unidentified	unidentified	Erbs and Newman, 2012
Fungi	Peptidoglycan	PGN	LYM1 & LYM3	LysM-RLP	Willmann <i>et al.</i> , 2011
	Ergosterol	unidentified	unidentified	unidentified	Granado <i>et al.</i> , 1995
	Cerebrosides	sphingoid base	unidentified	unidentified	Umemura <i>et al.</i> , 2002
	Xylanase	TKLGE pentapeptide	LeEIX2	LRR-RLP	Ron and Avni, 2004
	Necrosis-inducing proteins (NLP)	unidentified	unidentified	unidentified	Mattinen <i>et al.</i> , 2004
	Chitin	chitin oligosaccharides	CERK1	LysM-RLK	Shimizu <i>et al.</i> , 2010
Oomycetes	β -glucan	β -heptaglucan	GEBP	unidentified	Kishimoto <i>et al.</i> , 2011
	β -glucan	hepta- β -glucoside	GnGBP	unidentified	Klarzynski <i>et al.</i> , 2000
	Lipid-transfer proteins (elicitins)	unidentified	unidentified	unidentified	Osman <i>et al.</i> , 2001
	Transglutaminase	Pep13	unidentified	unidentified	Brunner <i>et al.</i> , 2002
	Cellulose-binding elicitor lectin (CBEL)	unidentified	unidentified	unidentified	Gaulin <i>et al.</i> , 2006
	Prosystemin	systemin	SR160	LRR-RLK	Scheer and Ryan, 2002
DAMPs	PEPR1	Pep1	PEPR1	LRR-RLK	Krol <i>et al.</i> , 2010
	Homoglacturonan	oligogalacturonides	WAK1	EGF-RLK	Brutus <i>et al.</i> , 2010

2. Perception des pathogènes et des toxines

La perception des éliciteurs ou des toxines produits par les pathogènes par les cellules végétales peut être réalisée au niveau extracellulaire ou intracellulaire, puis un signal est propagé à l'échelle de la plante entière afin d'activer les systèmes de défense de la plante. Ces éliciteurs sont regroupés en deux classes, les MAMPs/DAMPs (Microbe/Damage-Associated Molecular Patterns) et les effecteurs. Les MAMPs/DAMPs sont des structures qui sont conservées à travers toutes les classes de pathogènes : on y retrouve des oligogalacturonides, des ergostérols, la flagelline bactérienne, des xylkases, des protéines de choc thermique et des lipopolysaccharides. Ils jouent également un rôle essentiel dans la fitness et la survie du micro-organisme (**Tableau A-3**). D'après Jones et Dangl (2006), les effecteurs sont spécifiques à une ou quelques espèces très proches et contribuent à la virulence du pathogène en ciblant les défenses de l'hôte (**Tableau A-4**). Les toxines sont capables de tuer les cellules de la plante hôte et ainsi de favoriser l'infection de l'hôte par le pathogène qui les produit. Par exemple, *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 produit une toxine appelée coronatine qui est capable de mimer l'acide jasmonique et de perturber le contrôle de l'ouverture des stomates (Boller and Felix, 2009).

La détection extracellulaire des pathogènes se caractérise par la reconnaissance des MAMPs ou DAMPs par des récepteurs cellulaires, les PRRs (Pattern recognition receptors, protéines synthétisées dans le réticulum endoplasmique et transportées dans la membrane plasmique) et entraîne l'induction de la MTI. Les PRRs contiennent tous un domaine kinase intracellulaire qui permet la transduction du signal. Ils sont classés en fonction des autres domaines fonctionnels qui les constituent. Ainsi, il existe des récepteurs kinases à domaine riche en leucine (LRR-RKs), des récepteurs protéiques à domaine riche en leucine (LRR-RP), des récepteurs à domaine à motif lysine (LysM), et des récepteurs kinases à domaine Lectine (Lectin-RK) et à domaine EGF (epidermal growth factor, EGF-RK, **Tableau A-3** et **Figure A-15**). Les récepteurs LRR-RK forment des hétérodimères avec le récepteur LRR-RK BAK1. Par exemple, chez *Arabidopsis thaliana*, le récepteur LRR-RK AtFLS2 reconnaît la flagelline bactérienne flg22. Les récepteurs LRR-RP forment des hétérodimères avec plusieurs types de récepteurs LRR-RK tels que BAK1, SOBIR1 ou les deux à la fois. Le récepteur LRR-RP SVE1 reconnaît le peptide AVE1. AtRLP30 reconnaît le peptide fongique SCFE1. Les récepteurs LysM-RP forment des hétérodimères avec des récepteurs LysM-RK. Ainsi, le récepteur LysM-RP OsCEBIP reconnaît la chitine alors qu'AtLYM1, AtLYM3, OsLYP4 et OsLYP6 repèrent les peptidoglycanes bactériens (Böhm *et al.*, 2014).

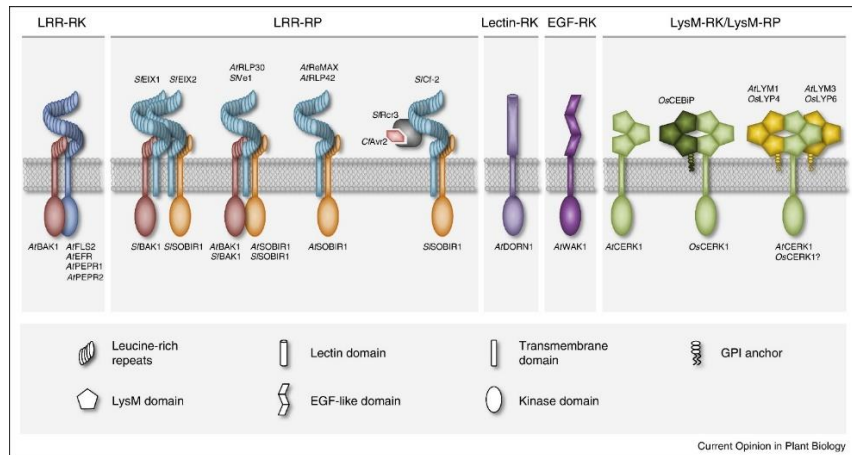


Figure A-15 : Exemples de quelques structures de différents récepteurs immunitaires membranaires dont les ligands sont connus (extrait de Böhm *et al.*, 2014).

Les récepteurs LRR-RK forment des hétérodimères avec le récepteur LRR-RK BAK1. Chez *Arabidopsis thaliana*, AtFLS2, AtEFR, AtPEPR1/AtPER2 reconnaissent respectivement la flagelline bactérienne flg22, le facteur d'élongation EF-Tu ou AtPEP1. Les récepteurs LRR-RP forment des hétérodimères avec plusieurs types de récepteurs LRR-RK tels que BAK1, SOBIR1 ou les deux à la fois. S/EIX1, S/EX2 et S/VE1 reconnaissent respectivement les xylases fongiques et le peptide AVE1. AtREMAX, AtRLP30 et AtRLP42 reconnaissent respectivement le peptide bactérien EMAX, le peptide fongique SCFE1 ou des endopolygalacturonases fongiques. S/ICF-2 reconnaît un complexe formé de l'effecteur Avr2 de *Cladosporium fulvum* et de sa cible S/RCR3. Les récepteurs de type LysM reconnaissent les ligands contenant des domaines N-acetylglucosamine (GlcNAc). Les récepteurs LysM-RP forment des hétérodimères avec des récepteurs LysM-RK. OSCEBIP reconnaît la chitine alors qu'AtLYM1, AtLYM3, OsLYP4 et OsLYP6 repèrent les peptidoglycans bactériens.

LRR-RKs : Récepteurs kinases à domaine riche en leucine. LRR-RP : Récepteurs protéiques à domaine riche en leucine. LysM : Récepteurs à domaine à motif lysine. Lectin-RK : Récepteurs kinases à domaine Lectine. EGF-RK: Récepteurs kinases et à domaine EGF (epidermal growth factor).

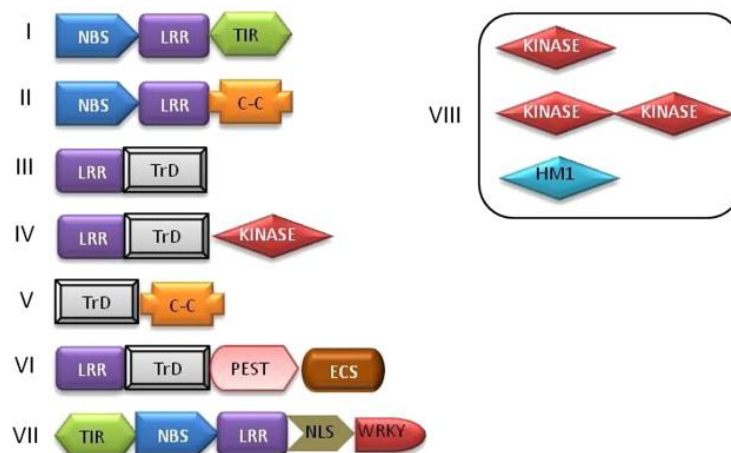


Figure A-16 : Exemples de classes majeures des différents récepteurs de reconnaissance des effecteurs (ERR) en fonction de leurs domaines fonctionnels (extrait de Gururani *et al.*, 2012).

LRR : Leucine rich repeats. NBS : Nucleotide-binding site. TIR : Toll/Interleukin-1- receptors. C-C : Coiled coil. TrD : Transmembrane domain. PEST : Protein degradation domain (proline-glycine-sérine-threonine). ECS : Endocytosis cell signaling domain. NLS : Nuclear localization signal. WRKY : Amino acid domain. HM1 : *Helminthosporium carbonum* toxin reductase enzyme.

La perception intracellulaire des pathogènes est réalisée par la reconnaissance d'effecteurs par des protéines de résistance ERR (effector recognition receptors) et induit l'ETI. Les gènes *ERR* sont classés en huit groupes différents en fonction de l'organisation des domaines protéiques (**Tableau A-4** et **Figure A-16**). La première classe regroupe les gènes encodant des protéines cytoplasmiques à domaine NBS (nucleotide-binding site), avec un C-terminal à domaine LRR (leucine rich repeat) et des domaines putatifs CC (coiled coil) au niveau du N-terminal. Cela correspond aux gènes de résistance à *P. syringae* *RPS2* et *RPM1* chez *Arabidopsis thaliana* (Coaker *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2011a). La seconde classe comprend des gènes codant pour des protéines cytoplasmiques à domaines NBS, LRR et TIR (toll-interleukin-1-receptor) tels que le gène *L6* conférant au lin (*Linum usitatissimum*) la résistance à la rouille (*Melampsora lini*) (Dodds *et al.*, 2006). Les gènes encodant des protéines sans domaine NBS mais avec un domaine extracytoplasmique riche en leucine (eLRR) lié à un domaine transmembranaire (TrD) constituent une troisième classe. Les gènes de résistance à *Cladosporium fulvum* (Ascomycètes causant le cladosporiose) *CF-9*, *CF-4* et *CF-2* chez la tomate encodent ces protéines (Rooney *et al.*, 2005). Le gène de résistance à *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (causant la bactériose du riz) *XA21* chez *Oryza sativa* code pour une protéine à domaine extracellulaire LRR, à domaine TrD et à domaine intracellulaire serine-threonine kinase (KIN) (Song *et al.*, 1995, page 21). Il est classé dans un quatrième groupe. La cinquième classe de gènes de résistance est constituée de gènes codant des protéines à domaines LRRs associés à un domaine PEST (Pro-Glu-Ser-Thr). Ce motif particulier est retrouvé chez le gène de résistance à la verticilliose *VE2* chez la tomate (Thomma *et al.*, 2011). Les gènes encodant des protéines contenant un domaine TrD fusionné à un domaine CC, comme *RPW8*, gène conférant une résistance au mildiou (*Golovinomyces* spp.) chez *Arabidopsis thaliana* (Wang *et al.*, 2009), forment le sixième groupe. La septième classe contient notamment le gène *RRS1-R* d'*Arabidopsis thaliana*. Il encode une protéine constituée des domaines TIR-NBS-LRR et confère à cette plante une résistance à *Ralstonia solanacearum*, agent causal d'un flétrissement bactérien (Deslandes *et al.*, 2003). La dernière classe regroupe les gènes encodant des enzymes ne contenant ni domaine LRR ni domaine NBS. Le gène de résistance à *Cochliobolus carbonum* (causant l'helminthosporiose du maïs) *HM1* chez *Zea mays* encode l'enzyme reductase de la toxine HC (toxine produite par le champignon, HC pour *Helminthosporium carbonum*, nom du stade anamorphe du pathogène) et permet de détoxifier les cellules (Johal and Briggs, 1992). La plupart de ces récepteurs sont codés par des gènes dominants, mais certains des récepteurs sont encodés par des gènes récessifs comme par exemple *RRS1-R* chez *Arabidopsis thaliana* ou encore *XA13* chez le riz (Gururani *et al.*, 2012).

Tableau A-4 : Exemples d'effecteurs, leurs sources, leurs cibles, leurs protéines ERR et leurs structures
(extrait de Muthamilarasan and Prasad, 2013).

Pathogen	Effector	Target	ERR-protein	ERR-protein structure	References
<i>Blumeria graminis</i>	Avr10	unidentified	MLA10	CC-NB-LRR	Ridout <i>et al.</i> , 2006
<i>Cladosporium fulvum</i>	Avr2	RCR3	SOBIR1	LRR-RP	Rooney <i>et al.</i> , 2005; Liebrand <i>et al.</i> , 2013
<i>Cladosporium fulvum</i>	Avr4	Chitinase	unidentified	unidentified	van den Burg <i>et al.</i> , 2006
<i>Hyaloperonospora parasitica</i>	AtR13	unidentified	RPP13	CC-NB-LRR	Allen <i>et al.</i> , 2004
<i>Hyaloperonospora parasitica</i>	AtR1	unidentified	RPP1	TIR-NB-LRR	Rehmany <i>et al.</i> , 2005
<i>Magnaporthe grisea</i>	AvrPi-ta	unidentified	Pi-ta	CC-NB-LRR	Jia <i>et al.</i> , 2000
<i>Melampsora lini</i>	AvrL567	unidentified	L5/L6/L7	TIR-NB-LRR	Dodds <i>et al.</i> , 2006
<i>Phytophthora infestans</i>	Avr3a	CMPG1	unidentified	unidentified	Bos <i>et al.</i> , 2010
<i>Potato virus X</i>	Coat protein	unidentified	Rx	CC-NB-LRR	Rairdan and Moffett, 2007
<i>Pseudomonas syringae</i>	AvrPtoB	FLS2, BAK1, FEN, CERK1	Prf	CC-NB-LRR	Göhre <i>et al.</i> , 2008
<i>Pseudomonas syringae</i>	AvrPphB	PBS1	RPS5	CC-NB-LRR	Zhang <i>et al.</i> , 2010
<i>Pseudomonas syringae</i>	AvrRpt2	RIN4	RPS2	CC-NB-LRR	Coaker <i>et al.</i> , 2005
<i>Pseudomonas syringae</i>	AvrRpm1	RIN4	RPM1	CC-NB-LRR	Liu <i>et al.</i> , 2011a
<i>Pseudomonas syringae</i>	AvrB	RIN4	RPG1-B/TAO1	TIR-NB-LRR	Eitas <i>et al.</i> , 2008; Liu <i>et al.</i> , 2011a
<i>Pseudomonas syringae</i>	AvrRps4	unidentified	RPS4	TIR-NB-LRR	Hinsch and Staskawicz, 1996
<i>Pseudomonas syringae</i>	HopAl-1	MPK3, MPK6	unidentified	unidentified	Zhang <i>et al.</i> , 2007
<i>Pseudomonas syringae</i>	HopU1	GRP7	unidentified	unidentified	Jeong <i>et al.</i> , 2011
<i>Pseudomonas syringae</i>	HopM1	AtMIN7	unidentified	unidentified	Nomura <i>et al.</i> , 2006
<i>Pseudomonas syringae</i>	HopAO1	Downstream of PTI signalling	unidentified	unidentified	Underwood <i>et al.</i> , 2007
<i>Pseudomonas syringae</i>	HopO1-1	Chloroplast protein	unidentified	unidentified	Fu <i>et al.</i> , 2007
<i>Pseudomonas syringae</i>	HopO1-2	Chloroplast protein	unidentified	unidentified	Fu <i>et al.</i> , 2007
<i>Pseudomonas syringae</i>	HopU1	AtGrp7, AtGrp8	unidentified	unidentified	Fu <i>et al.</i> , 2007
<i>Ralstonia solanacearum</i>	PopP2	unidentified	RRS1-R	TIR-NB-LRR	Deslandes <i>et al.</i> , 2003
<i>Tobacco mosaic virus</i>	P50	unidentified	N/NRG1	TIR-NB-LRR	Burch-Smith <i>et al.</i> , 2007
<i>Xanthomonas campestris</i>	AvrBs2	unidentified	Bs2	NB-LRR	Mudgett <i>et al.</i> , 2000
<i>Xanthomonas campestris</i>	AvrAC	BIK1, RIPK	unidentified	unidentified	Feng <i>et al.</i> , 2012
<i>Xanthomonas campestris</i>	AvrXv4	Cytoplasmic target	unidentified	unidentified	Roden <i>et al.</i> , 2004
<i>Xanthomonas campestris</i>	AvrBs3/PthA	UPA-box	unidentified	unidentified	Kay <i>et al.</i> , 2007
<i>Xanthomonas oryzae</i>	AvrRxo1	unidentified	Rxo1	TIR-NB-LRR	Zhao <i>et al.</i> , 2004

Parmi les exemples présentés ci-dessus, le classement MAMPs/effecteurs et PRRs/ERRs est actuellement remis en cause. En effet, certains MAMPs présentent une distribution étroite et/ou jouent un rôle dans la virulence du pathogène, deux caractéristiques normalement retrouvées chez les effecteurs. Ainsi, le PAMP PEP-13, un fragment accessible de la transglutiminase des parois cellulaires calcium-dépendantes (TGase) n'est présent que chez les oomycètes du genre *Phytophthora* (Brunner *et al.*, 2002). La reconnaissance des PAMPs peut être aussi restreinte à certaines familles de plantes, c'est le cas par exemple des PAMPs EF-Tu et des protéines cold-shock qui ne sont reconnues que par les Brassicacées et les Solanacées (Felix and Boller, 2003; Zipfel *et al.*, 2006). En ce qui concerne le rôle des PAMPs dans la virulence des pathogènes, la flagelline par exemple contribue à la virulence de pathogènes comme *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* : la réduction de la mobilité d'une souche mutée dans le gène codant la flagelline provoque une diminution de la virulence de cette souche (Taguchi *et al.*, 2006, 2010; Naito *et al.*, 2008). Le PAMPs hairpin HRPZ de la *Pseudomonas syringae* joue également un rôle dans la virulence du pathogène en modifiant l'intégrité de la membrane de son hôte (Lee *et al.*, 2001; Kvitko *et al.*, 2007, 2009; Engelhardt *et al.*, 2009).

Le gène *VE1* de la tomate a été désigné comme un gène de résistance *ERR* conférant une résistance à *Verticillium dahliae* et à *Verticillium albo-atrum* race 1 (Fradin *et al.*, 2009). Cette résistance interspécifique suggérerait que l'eliciteur AVE1 serait plutôt un MAMPs et non un effecteur et donc que le gène *VE1* encoderait une PRR (Thomma *et al.*, 2011).

Lorsque la cellule végétale a perçu le non-soi, le signal est propagé par la voie de la MTI et de l'ETI, puis les défenses de la plante sont mises en place.

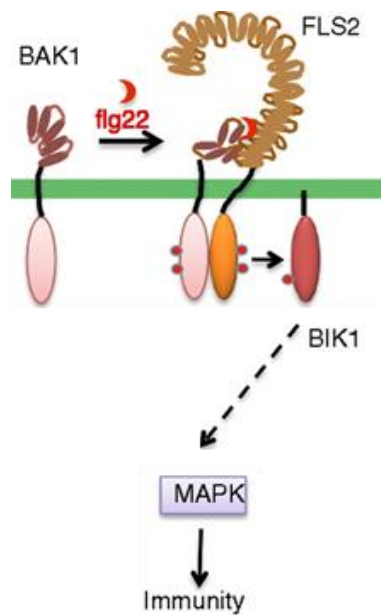


Figure A-17 : Reconnaissance du MAMP flagelline par les récepteurs de motifs PRR chez *Arabidopsis thaliana* (adapté de Wang, 2012).

La reconnaissance de la flagelline flg22 par FLS2 (Flagellin Sensitive 2) entraîne la phosphorylation de ce récepteur. FLS2 forme ensuite un dimère avec BAK1 (brassinostéroïde intensive 1-associated kinase) et BIK1 (*Botrytis*-induced kinase 1). Une transphosphorylation du complexe FLS2-BAK1 vers BIK1 a lieu lors de la dimérisation des récepteurs. BAK1 se désolidarise ensuite du complexe qu'il formait avec FLS2-BAK1. BIK1 active ensuite des cascades de MAPKs, provoquant ainsi la réponse immunitaire.

3. Transduction du signal

Dans le cas de la MTI, la détection des MAMPs déclenche une rapide hétérodimérisation des PRRs ainsi que leur phosphorylation (cela se réalise en moins de deux minutes). Cette transduction du signal est particulièrement décrite chez *Arabidopsis thaliana* en réponse au MAMP flagelline. Ainsi, l'interaction entre le récepteur PRR FLS2 et la flagelline flg22 provoque la phosphorylation du récepteur. FLS2 se dimérise avec BAK1 (brassinostéroïde intensitive 1-associated kinase) et BIK1 (*Botrytis*-induced kinase 1) (Chinchilla *et al.*, 2006; Heese *et al.*, 2007; Schulze *et al.*, 2010). Une transphosphorylation grâce au domaine kinase de BIK1 et FLS2-BAK1 a ensuite lieu grâce à un changement de conformation de BIK1 lors de la dimérisation des récepteurs (Lu *et al.*, 2010; Schulze *et al.*, 2010). La phosphorylation de BAK1 entraîne ensuite sa désolidarisation du complexe qu'il formait avec FLS2-BAK1. BIK1 active ensuite deux cascades simultanées de MAPK (Mitogen-activated protein kinases) MKK4/MKK5-MPK3/MPK6 et MEKK1/MKK1/MKK2-MPK4 (**Figure A-17**) conduisant ainsi à l'activation des facteurs de transcriptions WRKY (Asai *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2008; Laluk *et al.*, 2011; Belkhadir *et al.*, 2012; Wang, 2012). Ces facteurs de transcriptions sont des peptides de 60 acides aminés environ possédant une région WRKYGQK ainsi qu'un motif original en doigt de zinc constitué de résidus cystéine et histidine. Ce domaine de liaison à l'ADN interagit avec le motif W-box (TTGACC/T) des promoteurs des gènes de défense et active ainsi l'expression des gènes de défense impliqués dans la réponse précoce aux pathogènes (Navarro *et al.*, 2004; Ishihama and Yoshioka, 2012).

L'ETI débute par la reconnaissance des effecteurs par les protéines ERR. Dans le cas de protéines ERR de type NB-LRRs, cette reconnaissance peut avoir lieu par une interaction directe entre l'effecteur et le récepteur ou par une interaction indirecte au moyen de protéines associées aux récepteurs : c'est le changement de conformation de ces protéines associées qui provoque l'activation du signal (**Figure A-18**). Deux types de protéines accessoires existent : les protéines cibles de la virulence des effecteurs (modèle « guard ») ou des protéines appâts, d'origine végétale elles ont évolué afin de mimer les cibles des effecteurs (modèle « decoy »). En l'absence d'effecteurs, les protéines ERR NB-LRR maintiennent une liaison avec un ADP en interaction avec leurs différents domaines ou avec d'autres protéines végétales. L'interaction avec les effecteurs provoque une modification de la conformation des protéines NB-LRR, rendant ainsi disponible le site d'échange ADP/ATP. L'échange de nucléotide provoque un deuxième changement de conformation des protéines NB-LRR permettant ainsi aux domaines N terminaux des NB-LRRs (TIR ou CC) d'interagir avec d'autres molécules cibles (Takken and Tameling, 2009). Dans le cas du modèle « guard », la reconnaissance de l'effecteur AvrL567 de *Melampsora lini* par les récepteurs L5, L6 et L7 du lin est directement réalisée par plusieurs points de contact (Dodds *et al.*, 2006; Ravensdale *et al.*, 2012).

En ce qui concerne la reconnaissance indirecte des effecteurs, la protéine RIN4 d'*Arabidopsis thaliana* en est un exemple. En effet elle est ciblée par de multiples effecteurs (AvrRPT2, AvrRPM1, AvrB et

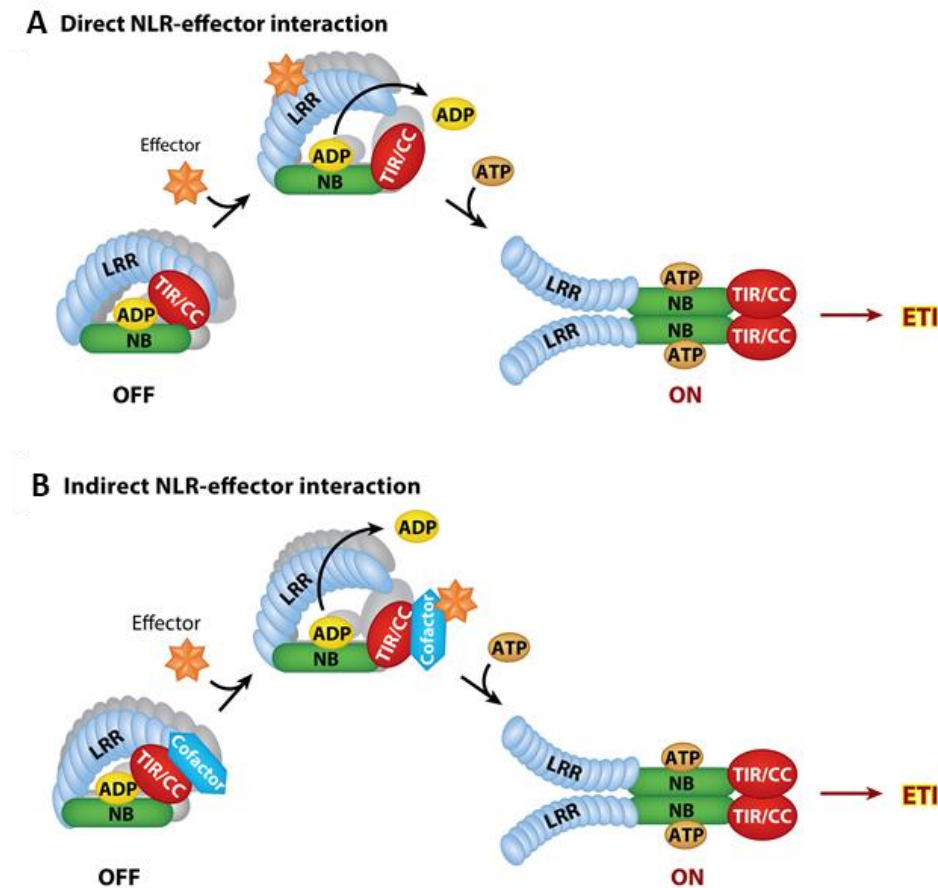


Figure A-18 : Reconnaissance des effecteurs par les protéines ERR de type NB-LRR conduisant à l'ETI (extrait de Cui *et al.*, 2015).

La reconnaissance spécifique des effecteurs à l'intérieur de la cellule est réalisée de façon directe (A) par une reconnaissance récepteur/ligand ou de façon indirecte (B) via la modification de la conformation d'une protéine garde ou appât de l'hôte (cofacteur, protéine « guard ou decoy »). En l'absence de l'effecteur, le récepteur NB-LRR reste en position « off » en maintenant un ADP par inhibition intramolécule entre les domaines LRR et les domaines CC/TIR (comme le récepteur L6 du lin en réponse à l'effecteur AvrL6 de *Melampsora lini*) ou par une inhibition intramolécule des domaines N terminaux de deux NB-LRRs hétérodimérisés (cas de RRS1/RPS4 chez *Arabidopsis thaliana* en présence de l'effecteur POPP2 de *Ralstonia solanacearum*, le second récepteur NB-LRR est représenté en gris sur ce schéma). L'activation des complexes NB-LRR cause un échange de l'ADP par de l'ATP au niveau du domaine NB et par une série de modifications de la conformation du récepteur NB-LRR, il se retrouve en position « on » et active l'ETI.

HOPF2) et est associée à deux protéines de type CC-NB-LRR (RPM1 et RPS2) (Leister *et al.*, 1996; Mackey *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2005). AvrRPM1 et AvrB induisent la phosphorylation de RIN4 et ACRRPT2 clive RIN4 et induit sa dégradation. La phosphorylation et la dégradation de RIN4 induisent deux ETI, soit par la voie de RPM1, soit par celle de RPS2 (Axtell and Staskawicz, 2003; Mackey *et al.*, 2003; Wilton *et al.*, 2010). Différentes études ont montré que les protéines NB-LRRs activées se trouvaient au sein du noyau des cellules. Par exemple, les protéines TIR-NB-LRRs RRS1-R, RPS4 et SNC1 chez *Arabidopsis* doivent être localisées et accumulées au sein du noyau afin de déclencher une ETI complète (Deslandes *et al.*, 2003; Wirthmueller *et al.*, 2007; Cheng *et al.*, 2009). Au sein du noyau, les protéines NB-LRRs régulent ensuite directement l'expression des gènes de défense, soit grâce à leur domaine de liaison à l'ADN, soit en se liant avec des facteurs de transcription. Ainsi, chez *Arabidopsis thaliana*, cette régulation a lieu grâce au domaine WRKY de RRS1-R, et chez l'orge (*Hordeum vulgare*), MLA10 forme une liaison avec les facteurs de transcription WRK1 et WRK2 après reconnaissance de l'effecteur Avr10 de *Blumeria graminis* (oïdium) afin de réguler l'expression des gènes de défense (Caplan *et al.*, 2008). Ces résultats suggèrent que l'ETI n'impliquerait pas un grand nombre de composés et qu'elle serait rapidement mise en place directement au sein du noyau (Cheng *et al.*, 2009).

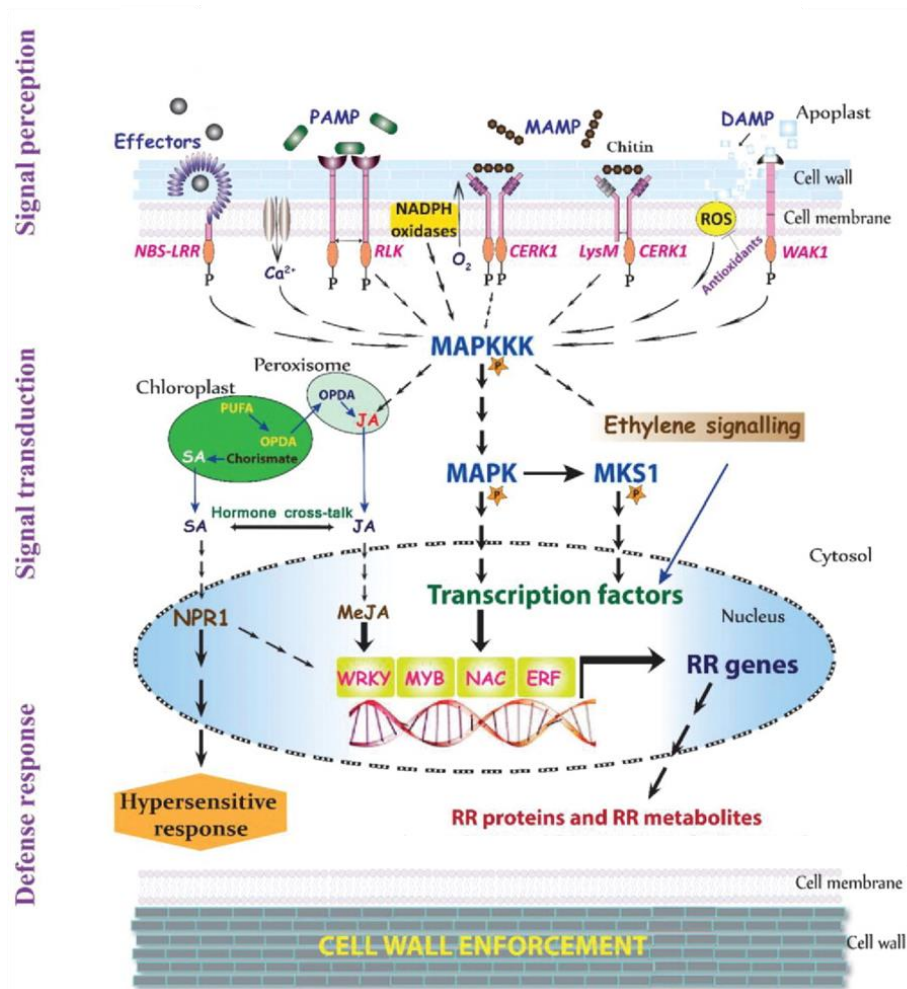


Figure A-19 : Rôles des principaux composés impliqués dans les interactions plante/pathogène (extrait de Kushalappa *et al.*, 2016).

Les plantes détectent des éliciteurs (MAMPs/DAMPs et effecteurs) produits par les pathogènes lors de l'infection. La reconnaissance des éliciteurs entraîne l'activation de gènes et la synthèse de protéines RR (resistance-related) impliquées dans la résistance (elicitor recognition receptor (ELRR), effector recognition receptor (ERR), phytohormone (PHR), mitogen-activated protein kinase (MAPK), transcription factor (TF)) et la production de métabolites et de protéines liées à la résistance (RRMs et RRs) qui empêchent la colonisation des pathogènes. Les MAMPs/DAMPs sont reconnus par les ELRR (ou PRR) et les effecteurs par les ERR. Par exemple, les effecteurs peuvent-être reconnus par des récepteurs de type NB-LRRs conduisant à une HR via la voie des MAPK/SA/NPR1. Les MAMPs comme la chitine sont reconnus par des récepteurs RLK et des récepteurs de chitine à domaine LysM (CERK1 : domain chitin elicitor receptor kinase) et activent les défenses de la plante par la voie des MAPK kinase kinase (MAPKKK). Les DAMPs sont reconnus par des récepteurs kinases associés à la paroi végétale (WAKs : wall-associated receptor kinases) et activent également les défenses de la plante par la voie des MAPKKK. La perception du pathogène provoque également l'activation de seconds messagers tels que le Ca²⁺, les ROS et les phytohormones (ET, SA et JA) qui conduisent à une réponse hypersensible (HR) ou à une sensibilité réduite. La transduction du signal est effectuée par une cascade de MAPK telle que la voie des MAPKKK afin d'activer des facteurs de transcription chez la plante (WRKY, MYB (myeloblastosis-related proteins), NAC (no apical meristem/*Arabidopsis* transcription activation factor/Cup-shaped cotyledon) et ERF (Ethylene responsive factor) qui régulent la production des RRs et RRs. Les RRs sont des phytoanticipines et des phytoalexines, ou des produits qui permettent de renforcer les structures secondaires des parois permettant de contenir l'infection du pathogène.

4. Mécanismes de défense contre les pathogènes

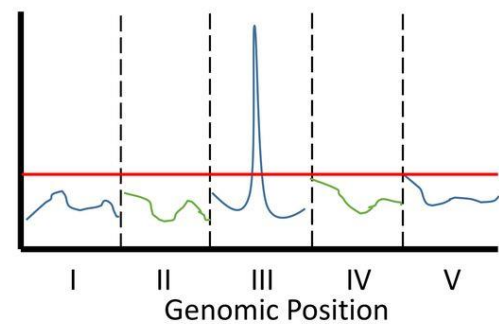
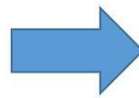
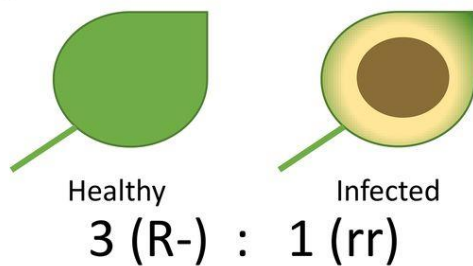
La **Figure A-19** illustre les différentes étapes de perception du pathogène, de transduction du signal et de mise en place des défenses chez la plante (Kushalappa *et al.*, 2016). La perception des MAMPs/DAMPs entraîne un influx de Ca^{2+} dans le cytosol. Cet influx est positivement régulé par BIK1 chez *Arabidopsis* et hypothétiquement par d'autres protéines de cette famille (Li *et al.*, 2014a). Cet influx induit l'ouverture d'autres transporteurs membranaires (influx de H^+ , efflux de K^+ , Cl^- , NO_3^-), conduisant à une alkanalisation extracellulaire après perception du pathogène et une dépolarisation de la membrane plasmique (Jeworutzki *et al.*, 2010). Un relargage extracellulaire de ROS (radicaux libres dérivés de l'oxygène-Reactive Oxygen Species) et de RNS (radicaux libres dérivés de l'azote-Reactive Nitrogen Species) est également présent après la perception des MAMPs/DAMPs. La production de ROS est directement liée à l'augmentation en Ca^{2+} intracellulaire : chez *Arabidopsis*, des ROS sont relâchés par l'oxydase NADPH localisée sur la membrane plasmique et nommée RBOHD (respiratory burst oxidase homolog D) par activation par BAK1 et par des protéines kinases calcium dépendantes (Li *et al.*, 2014a; Kadota *et al.*, 2014). En plus de ce mécanisme décrit chez l'arabette, il existe aussi chez les plantes d'autres sources de ROS (chloroplastes, mitochondries, peroxisomes...) (Baxter *et al.*, 2014). Ces ROS comme l'anion superoxyde ou le peroxyde d'hydrogène jouent ensuite un rôle anti-microbien par contact direct avec les pathogènes, en renforçant les parois cellulaires par synthèse de callose (polymère de β -1,3-glucane) ou encore en induisant la synthèse d'acide salicylique (SA), en activant une cascade de MAPK ou en activant la réponse systémique acquise (SAR) grâce à une propagation des ROS (Nühse *et al.*, 2007). Quant aux RNS, ils interviennent à différentes étapes de la transduction du signal en régulant notamment l'expression des gènes NPR1 (non-expresser of PR genes 1) qui contrôlent l'expression des gènes PR (pathogenesis-related) (Tada *et al.*, 2008; Yun *et al.*, 2011). Au sein des cellules de garde des stomates, l'élévation de la concentration en Ca^{2+} provoque une augmentation en peroxyde d'hydrogène et en monoxyde d'azote résultant finalement à une fermeture des stomates. Durant la MTI, les plantes peuvent également réduire leur activité photosynthétique et ainsi limiter la quantité de carbone mise à disposition du pathogène (Göhre *et al.*, 2012). La MTI implique également les voies de biosynthèse de l'acide salicylique, de l'acide jasmonique (JA) et de l'éthylène (ET) (Göhre *et al.*, 2012).

La chaîne d'événements impliquée dans l'ETI partage des composants identiques à celles de la MTI avec notamment l'activation d'une cascade de MAPK et des facteurs de transcriptions WRKY. Ainsi, l'activation de ces facteurs de transcription permet notamment une transcription rapide des gènes PR (pathogenesis-related) dans les cellules infectées et leurs cellules voisines. Il s'agit de gènes impliqués dans la synthèse de SA, JA, ET, dans le renforcement de la paroi cellulaire, dans la lignification, et dans la production de divers composés anti-microbiens dans le réticulum endoplasmique et sécrétés dans des vacuoles (Eichmann and Schäfer, 2012; Nomura *et al.*, 2012). Puis le SA accumulé dans les zones

infectées peut se lier au récepteur NPR3 (Non-expressor of *PR* 3 genes) avec une faible affinité et contrôler la dégradation de NPR1. Ceci conduit à une réaction HR, forme de mort cellulaire programmée caractérisée par un rétrécissement cytoplasmique, une condensation de la chromatine, un gonflement des mitochondries, une vacuolisation et une perturbation des chloroplastes (Hayward *et al.*, 2009). Cette HR n'est pas toujours présente lors de l'ETI.

Lors de l'ETI et de la MTI, le SA produit sous forme de méthyl-SA (MeSA) au niveau du site d'infection se déplace également de cellules en cellules via les plasmodesmes de la plante ou le phloème. L'accumulation de ce MeSA au niveau des parties distales de la plante provoque l'activation de la SAR, conduisant ainsi à l'expression des gènes *PR* et à la protection des tissus non infectés (Muthamilarasan and Prasad, 2013). Dix-sept familles de PRs poids (<10 kDa) ont pu être identifiées dont certaines font parties des RRP (Resistant Related Proteins) et ont des propriétés anti-microbiennes, de dégradation de toxines, et de renforcement des parois cellulaires. Les protéines PR, les β -1-3-glucanases (PR-2), et les endochitinases (PR-3, 4, 8 et 11) dégradent les parois des cellules des pathogènes. Les chitinases dégradent la paroi des champignons et les β -1-3-glucanases dégradent les glucanes présents dans les parois cellulaires bactériennes. Les inhibiteurs de protéinases (PR-6), les défensines (PR-12), les thionines (PR-13) et les protéines de transferts de lipides (PR-14) ont des activités anti-bactériennes et anti-fongiques à large spectre. Les membres des familles PR-1 et des thaumatines-like PR5 provoquent une résistance à certains oomycètes (Nawrot *et al.*, 2014).

Qualitative Resistance



Quantitative Resistance

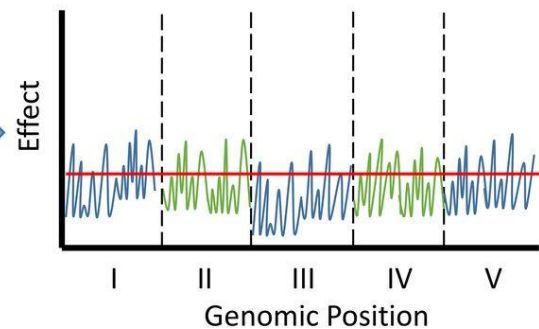
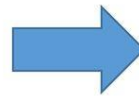
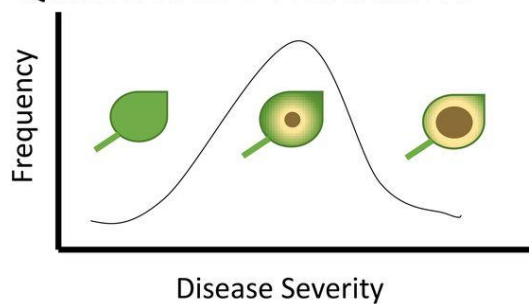


Figure A-20 : Différences de phénotypes et de contrôles génétiques des résistances qualitatives et quantitatives (extrait de Corwin and Kliebenstein, 2017).

La résistance qualitative se caractérise par deux classes phénotypiques et un petit nombre de loci contrôlant la résistance. La résistance quantitative est contrôlée par de multiples loci à effets faibles à modérés et une distribution continue des phénotypes est observée.

III. Contrôle génétique de la résistance aux maladies chez les plantes, notamment contre la verticilliose

Deux types de résistance sont décrites : les résistances qualitatives et quantitatives. Il sera considéré dans la suite de cette partie que la résistance qualitative aux maladies est caractérisée par des classes discrètes d'individus résistants et sensibles ségrégeant selon les lois mendéliennes dans le cas d'un petit nombre de locus contrôlant la résistance. Dans ce cas, un petit nombre de loci à larges effets explique ce phénotype et leur validation fonctionnelle est relativement facile (**Figure A-20**). Au contraire, pour une QDR (quantitative disease resistance), il existe une continuité de la distribution des phénotypes entre individus sensibles et résistants et un grand nombre de loci à effets faibles à modérés contrôlent la résistance. Plus l'effet est petit, et plus la validation fonctionnelle de tels gènes est compliquée (**Figure A-20**). De plus, cette QDR est également influencée par l'environnement (Roux *et al.*, 2014; Niks *et al.*, 2015; French *et al.*, 2016; Corwin and Kliebenstein, 2017)

Cette dichotomie est aujourd'hui en partie remise en cause depuis le développement de nouvelles méthodes d'identification des bases génétiques responsables des traits observés et depuis l'utilisation de méthodes de phénotypage plus précises. En effet, une résistance qualitative peut être partielle dans le cas par exemple d'une évolution des gènes encodant les protéines R ou PRRs, altérant l'efficacité de la résistance. Quant à la QDR, l'accumulation de multiples loci de résistance peut conférer un haut niveau de résistance s'apparentant à une résistance complète (Roux *et al.*, 2014; Niks *et al.*, 2015; French *et al.*, 2016; Corwin and Kliebenstein, 2017).

A. INTRODUCTION

Tableau A-5 : Exemples de gènes *R* impliqués dans la résistance qualitative aux pathogènes (extrait de Kushalappa *et al.*, 2016).

Gene name	Role	Crop	Pathogen	Reference
ELICITOR AND EFFECTOR RECOGNITION RECEPTOR GENES (ELRR and ERR)				
<i>R1 (receptor gene)</i>	Receptor activity	Potato	<i>Phytophthora infestans</i>	Yogendra <i>et al.</i> , 2014, 2015
<i>ELR (receptor-like protein)</i>	Elicitin recognition	Potato	<i>Phytophthora infestans</i>	Bellés <i>et al.</i> , 2008
<i>XA39</i>	Broad-spectrum hypersensitive response R gene	Rice	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2015a
<i>LECRK-VI.2</i>	Activates pattern-triggered immunity	Arabidopsis	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Yeh <i>et al.</i> , 2015
<i>FLAGELLIN-SENSITIVE 2 (FLS2) receptor kinase</i>	Initiates downstream defense response	Arabidopsis	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Zeng and He, 2010
<i>CERK1</i>	Crucial for chitin elicitor signaling	Arabidopsis	<i>Alternaria brassicicola</i>	Miya <i>et al.</i> , 2007
<i>LYSM RLK1</i>	Essential for chitin signaling	Arabidopsis	<i>Erysiphe cichoracearum</i>	Wan <i>et al.</i> , 2008
<i>TACPK2-A</i>	Activate immune and stress signaling networks	Rice	<i>Blumeria graminis tritici</i>	Geng <i>et al.</i> , 2013
<i>NbWIPK and NbSIPK</i>	Activates downstream defense signaling against pathogen-derived elicitors	Nicotiana benthamiana	<i>Pseudomonas cichorii</i> , <i>Phytophthora infestans</i>	Sharma <i>et al.</i> , 2003
MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASES (MAPKs)				
<i>CML9</i>	Regulates flagellin-dependent signaling pathway	Arabidopsis	<i>Pseudomonas syringae</i>	Leba <i>et al.</i> , 2012
<i>SIMKK2 and SIMKK4</i>	Positive regulator of defense response	Tomato	<i>Botrytis cinerea</i>	Li <i>et al.</i> , 2014
<i>GHMPK16</i>	Activation of multiple signal transduction pathways	Arabidopsis	<i>Colletotrichum nicotianae</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Pseudomonas solanacearum</i>	Shi <i>et al.</i> , 2011
<i>OXI1 protein kinase</i>	Regulates effector-triggered immunity	Arabidopsis	<i>Hyaloperonospora parasitica</i> , <i>Pseudomonas syringae</i>	Petersen <i>et al.</i> , 2009
<i>OsNPR1/NH1</i>	Regulator of SA-mediated resistance	Rice	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	Gallego-Giraldo <i>et al.</i> , 2011
TRANSCRIPTION FACTOR GENES (TF)				
<i>OsWRKY13</i>	Activator and suppressor of SA and JA pathways, respectively	Rice	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> , <i>Magnaporthe grisea</i>	Giberti <i>et al.</i> , 2012
<i>GHWRKY44</i>	Positive regulation of plant-pathogen interaction	Nicotiana benthamiana	<i>Ralstonia solanacearum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i>	Li <i>et al.</i> , 2015a
<i>GaWRKY1</i>	Regulates biosynthesis of sesquiterpene phytoalexins	Cotton	<i>Verticillium dahliae</i> extracts	Xu <i>et al.</i> , 2004
<i>OsWRKY89</i>	Regulation of wax and lignin biosynthesis	Rice	<i>Magnaporthe oryzae</i>	Wang <i>et al.</i> , 2007
<i>OsWRKY30</i>	Positively regulates PR10 defense gene	Rice and Arabidopsis	<i>Pectobacterium carotovora</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> , <i>Xanthomonas oryzae</i>	Lee <i>et al.</i> , 2013
<i>WRKY8</i>	Regulates abscisic acid and ethylene signaling pathways	Arabidopsis	<i>Tobacco mosaic virus</i>	Chen <i>et al.</i> , 2013
<i>SIDRW1</i>	Positive regulator of defense response	Tomato	<i>Botrytis cinerea</i>	Liu <i>et al.</i> , 2014b
<i>TaPIMP1</i>	Regulation of Absciscic acid (ABA) and SA signaling pathway genes	Wheat	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2012
<i>SISRNI</i>	Positive regulator of defense response	Tomato	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Liu <i>et al.</i> , 2014a
<i>NtERF3</i>	Induces hypersensitive-response-like cell death	Tobacco	<i>Tobacco mosaic virus</i>	Ogata <i>et al.</i> , 2012
<i>TiERF1</i>	Mediates resistance through ethylene-dependent pathway	Wheat	<i>Rhizoctonia cerealis</i>	Chen <i>et al.</i> , 2008
<i>TaPIE1</i>	Regulates ethylene-dependent defense response	Wheat	<i>Rhizoctonia cerealis</i>	Zhu <i>et al.</i> , 2014
<i>BOTRYTIS SUSCEPTIBLE 1 (BOS1)</i>	Mediates ROS signals and regulates JA signaling pathway	Arabidopsis	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Alternaria brassicicola</i>	Mengiste, 2003
<i>TaMYB4</i>	Induces defense response	Wheat	<i>Puccinia striiformis</i> f. sp. <i>tritici</i>	Al-Attala <i>et al.</i> , 2014
<i>TAMYB30</i>	Regulates very-long-chain fatty acids biosynthesis	Tobacco	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	Raffaele <i>et al.</i> , 2008
<i>TaNAC4</i>	Transcriptional activator	Wheat	<i>Puccinia striiformis</i> f. sp. <i>tritici</i>	Xia <i>et al.</i> , 2010
<i>TaPIEP1</i>	Activation of ET/JA-dependent defense genes	Wheat	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	Dong <i>et al.</i> , 2010
OTHER REGULATORY GENES				
<i>EIF2</i>	Required for innate immunity	Wheat	<i>Puccinia striiformis</i> f. sp. <i>tritici</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2013
<i>TaHIR1 and TaHIR3</i>	Induces hypersensitive response	Wheat	<i>Puccinia striiformis</i> f. sp. <i>tritici</i>	Duan <i>et al.</i> , 2013
<i>TaNPSN SNARE</i>	Vesicle-mediated resistance	Wheat	<i>Puccinia striiformis</i> f. sp. <i>tritici</i>	Wang <i>et al.</i> , 2014a
<i>OsBIDK1</i>	Diacylglycerol kinase activity	Tobacco	<i>Tobacco mosaic virus</i> , <i>Phytophthora parasitica</i> var. <i>nicotianae</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2008
<i>TaMCA4 (metacaspase 4)</i>	Induces programmed cell death	Wheat	<i>Puccinia striiformis</i> f. sp. <i>tritici</i>	Wang <i>et al.</i> , 2012

1. Résistance qualitative aux pathogènes

Les gènes responsables de résistances qualitatives (ou résistances gène pour gène) sont aujourd'hui les plus décrits. La résistance des plantes aux pathogènes est contrôlée par des gènes *R* qui activent la synthèse de métabolites (RRMs) et de protéines (RRPs) qui vont directement supprimer l'invasion du pathogène par leur propriété anti-microbienne ou par un renforcement des parois cellulaires (Kushalappa *et al.*, 2016).

Les gènes *R* peuvent être divisés en quatre classes différentes en fonction de leur nature : les PRRs et ERRs, les MAPKs, les facteurs de transcriptions (TFs) et une quatrième classe regroupant les autres gènes (**Tableau A-5**). Chacune de ces classes contient des gènes présentés lors de la description de l'ETI et de la MTI. En effet, les mécanismes moléculaires mis en place lors de la résistance qualitative peuvent appartenir à chacune de ces deux voies de signalisation.

Les RRP et les RRM peuvent être exprimés constitutivement au sein de la plante (avant l'invasion par le pathogène) ou induits par l'invasion du pathogène. Les quantités de protéines et métabolites présentes dépendent à la fois des gènes de résistance *R* (dont les facteurs de transcription). Les RRP sont composées des protéines PR qui détruisent les pathogènes, les toxines, les facteurs d'avirulence et empêchent leur progression. Les RRM sont constitués de phytoanticipines et de phytoalexines. Le **Tableau A-6** regroupe des exemples de RRP et de RRM décrits chez les plantes. Il est intéressant de noter qu'il n'existe pas de frontière claire permettant de classer ces protéines dans les mécanismes de résistance quantitative ou qualitative. En effet, un gène de résistance *R* conférant une résistance qualitative à un pathogène peut induire une QDR en réponse à un autre pathogène (on parle alors de gène *R* faible). L'implication du même gène *R* dans ces résistances induit alors l'expression de RRP et de RRM en commun (Kushalappa *et al.*, 2016). Par exemple, chez *Arabidopsis thaliana*, le gène *RPS4* est impliqué dans la résistance qualitative à *Pseudomonas syringae* pv. *ptsi* et dans la résistance quantitative à *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* race 6 (Debieu *et al.*, 2016).

Le nombre de loci impliqué dans les résistances qualitatives étant faible (modèle gène pour gène), le contournement de telle résistance par les pathogènes est généralement rapide. Souvent les interactions plantes-pathogènes de ce type présentent des cycles d'évolution en dents de scie (« boom and burst ») où l'apparition d'un gène de résistance *R* majeur est rapidement contournée par l'apparition de nouveaux éliciteurs virulents (McDonald and Linde, 2002). Le cas de la rouille noire (*Puccinia graminis*) du blé (*Triticum aestivum*) illustre ce phénomène. Par exemple, la race Ug99 (apparue en Ouganda en 1999) est virulente sur l'ensemble des cultivars possédant les gènes *R* identifiés (49 gènes de ce type ont été décrits) (Singh *et al.*, 2006; Ayliffe *et al.*, 2008).

A. INTRODUCTION

Tableau A-6 : Exemples de gènes codant les RRM et RRP impliqués dans la résistance aux pathogènes (extrait de Kushalappa *et al.*, 2016).

Gene name	Role	Crop	Pathogen	Reference
GENES BIOSYNTHESIZING RRP				
<i>Dahlia merckii</i> defensin (DmAMP1)	Defensin	Rice	<i>Magnaporthe oryzae</i> , <i>Rhizoctonia solani</i>	Jha <i>et al.</i> , 2009
CABPR1	Pathogenesis-related protein 1	Tobacco	<i>Phytophthora nicotianae</i> , <i>Ralstonia solanacearum</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> .	Sarowar <i>et al.</i> , 2005
CALTP1 and CALTP2	Lipid transfer protein	Tobacco	<i>Phytophthora nicotianae</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> , pv. <i>tabaci</i>	Sarowar <i>et al.</i> , 2009
SN1	Potato antimicrobial peptide	Wheat	<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i>	Rong <i>et al.</i> , 2013
Lactoferrin	Broad-spectrum antimicrobial peptide	Wheat	<i>Fusarium graminearum</i>	Han <i>et al.</i> , 2012
Chitinase and 8-1,3 glucanase	PR protein	Wheat	<i>Fusarium graminearum</i>	Anand <i>et al.</i> , 2003
NAD1 and NAD2	Class-I and -II defensin protein	Oats	<i>Puccinia</i> spp.	Dracatos <i>et al.</i> , 2014
HPA1XOO	Harpin protein	Cotton	<i>Verticillium dahliae</i>	Miao <i>et al.</i> , 2010
GENES BIOSYNTHESIZING RRM				
CYP71Z2	Phytoalexins	Rice	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	Li <i>et al.</i> , 2015c
Lipoxygenase (LOX)	Jasmonic acid, Methyl jasmonate	Maize	<i>Fusarium verticillioides</i>	Christensen <i>et al.</i> , 2014
Allene oxide synthase (AOS)	Jasmonic acid, Methyl jasmonate	Rice	<i>Magnaporthe grisea</i>	Mei <i>et al.</i> , 2006
Indole glycerol phosphate lyase	DIMBOA glucoside DIMBOA, DIBOA	Maize	<i>Setosphaeria turcica</i>	Ahmad <i>et al.</i> , 2011
Callose synthase (PMR4)	Callose	Barley	<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>hordei</i>	Blümke <i>et al.</i> , 2013
Linalool synthase	Linalool	Rice	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	Taniguchi <i>et al.</i> , 2014
Resveratrol synthase (VST1 and VST2) pinosylvin synthase (PPS)	Resveratrol and pinosylvin-like compounds	Wheat	<i>Puccinia recondita</i> f. sp. <i>tritici</i>	Serazetdinova <i>et al.</i> , 2005
PinA and PinB	Puroindolines	Rice	<i>Magnaporthe oryzae</i> , <i>Rhizoctonia solani</i>	Krishnamurthy <i>et al.</i> , 2001
Squalene synthase (SQS)	Terpenoids: squalene and withanolides	Withania somnifera	<i>Botrytis cinerea</i>	Singh <i>et al.</i> , 2015
Agmatine coumaroyl transferase (TaACT)	p-coumaroylagmatine p-coumaroylputrescine	Wheat	<i>Fusarium graminearum</i>	Gunnaiah <i>et al.</i> , 2012
Agmatine coumaroyl transferase (ACT)	p-coumaroylagmatine, feruloylagmatine, p-coumaroylputrescine, feruloylputrescine	Arabidopsis	<i>Alternaria brassicicola</i>	Muroi <i>et al.</i> , 2009
Cinnamoyl alcohol dehydrogenase (CAD)	G and S lignin monomers	Arabidopsis	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Tronchet <i>et al.</i> , 2010
Tyrosine decarboxylase (TyDC)	Feruloyltyramine Caffeoyletyramine Feruloyloctopamine	Potato	<i>Phytophthora infestans</i>	Yogendra <i>et al.</i> , 2014, 2015
Tyramine hydroxycinnamoyl transferase (THT)	Feruloyltyramine Caffeoyletyramine Feruloyloctopamine	Potato	<i>Phytophthora infestans</i>	Yogendra <i>et al.</i> , 2014, 2015
Cinnamoyl-CoA reductase (CCR)	Hydroxycinnamaldehydes (Coniferaldehyde)	Arabidopsis	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Lauvergeat <i>et al.</i> , 2001
Caffeic acid/5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase (COMT)	Sinapaldehyde Sinapyl alcohol	Tobacco	<i>Tobacco mosaic virus (TMV)</i>	Maury <i>et al.</i> , 1999
L-phenylalanine ammonia lyase (PAL)	trans-Cinnamic acid	Rice	<i>Magnaporthe oryzae</i>	Giberti <i>et al.</i> , 2012

2. Résistance quantitative aux maladies

Peu de gènes ont été décrits dans la réponse quantitative aux maladies et leurs types et fonctions sont très divers (**Tableau A-7**). Ces gènes peuvent être catégorisés par rapport à leur fonction. Ainsi, certains de ces gènes confèrent une résistance lorsqu'ils sont exprimés lors de stades spécifiques de développement de la plante ou encore grâce à de hauts niveaux d'expression. Certaines QDR sont conférées par des kinases associées aux parois végétales (WAKs : wall-associated kinases), par des formes altérées de gènes de résistance codant des protéines NB-LRR, par des récepteurs LRR, par des pertes de fonction d'allèles de sensibilité ou encore par des modifications du métabolisme de la plante hôte. Les gènes impliqués dans la QDR du coton à *Verticillium dahliae* seront présentés à partir de la page 87).

a. QDR par expression de gènes dépendant du stade phénologique de l'hôte

Chez le maïs, le QTL (quantitative trait loci) *qHSR1* (d'une taille approximative de 2 Mb et situé sur le chromosome 2 entre les marqueurs SR148152 et SNP661) de résistance au charbon (*Sporisorium reilianum*) a été mis en évidence à partir de populations back-cross générées après croisement du parent résistant Ji1037 (parent donneur) et du parent sensible Huangzao4 (parent récurrent) (Chen *et al.*, 2008b). A partir de ces données, de nouvelles populations ont été générées et de nouveaux marqueurs développés afin d'obtenir finalement une population de 140 individus recombinants et un QTL réduit à une taille de 152 kB. Cinq gènes candidats étaient présents dans cette zone, mais seul le gène *ZmWAK* était exprimé dans tous les tissus de toutes les plantes résistantes au charbon. La séquence codante du gène *ZmWAK* ainsi que son promoteur ont ensuite été clonés, et des plantes transgéniques issues du fond génétique hybrid Hi-II ont été générées. Ces plantes étaient ensuite croisées avec HZ4, accession ne possédant pas le gène *ZmWAK* pour produire une F₁. Les individus de cette population ont ensuite été soit autofécondés, soit croisés de nouveau avec l'accession HZ4 afin d'obtenir des individus en F₂, en BC₁F₁ et en BC₂F₂. Ce sont ces individus qui ont ensuite été inoculés par *Sporisorium reilianum* et ont montré une résistance accrue au charbon. L'extinction de l'expression de ce gène a également été réalisée en utilisant les ARN interférents et en suivant la même stratégie afin de produire les individus à tester : des plantes transgéniques issues du fond génétique hybrid Hi-II ont été générées puis croisées et rétrocroisées avec l'accession Ji1037. La population BC₁F₁ obtenue a montré une augmentation de la sensibilité à *Sporisorium reilianum* par rapport au témoin non transgénique. Ce gène *ZmWAK* encode un récepteur kinase protéique avec un domaine caractéristique des kinases associées à la paroi cellulaire et dont l'activité kinase est nécessaire à sa fonction de signalisation. L'expression de *ZmWAK* est induite un jour après infection par *Sporisorium reilianum*. Ce pathogène infecte les jeunes plantes par les racines et colonise le mésocotyle et le coléoptile chez les

A. INTRODUCTION

Tableau A-7 : Gènes impliqués dans la QDR et méthodes d'identification et de validation fonctionnelle (adapté de French *et al.*, 2016).

Gene	Type	Pathogen(s)	Disease	Host	Candidate Genes identification	Functional validation methods	Reference
<i>CYP82G1</i> <i>GORK</i> <i>GDSL</i>	cytochrome P450 monooxygenase guard cell outward rectifying K ⁺ channel GDSL-motif esterase/acyltransferase/lipase	<i>Alternaria brassicae</i>	alternaria leaf blight	<i>Arabidopsis</i>	GWA mapping	Insertional mutants	Rajarammohan <i>et al.</i> , 2018
<i>HTN1</i>	wall-associated kinase, non RD	<i>Exserohilum turcicum</i>	northern corn leaf blight	maize	High resolution mapping	TILLING mutants	Hurni <i>et al.</i> , 2015
<i>LR34</i>	putative ABC transporter	<i>Puccinia striiformis</i> , <i>Puccinia triticina</i> , <i>Blumeria graminis</i>	stripe rust, leaf rust, powdery mildew	wheat	High resolution mapping	TILLING mutants (γ-irradiation and sodium azide-induced mutants)	Krattinger <i>et al.</i> , 2009
<i>LR67</i>	hexose transporter	<i>Puccinia striiformis</i> , <i>Puccinia triticina</i> , <i>Puccinia graminis</i> , <i>Blumeria graminis</i>	stripe rust, leaf rust, stem rust, powdery mildew	wheat	High resolution mapping	TILLING mutants (γ-irradiation and ethyl methane sulfonate-induced mutants)	Moore <i>et al.</i> , 2015
<i>PFT</i>	chimeric lectin	<i>Fusarium graminearum</i>	fusarium head bligh	wheat	High resolution mapping	TILLING mutants, RNAi & expression of the resistance gene	Rawat <i>et al.</i> , 2016
<i>PI21</i>	proline containing protein	<i>Magnaporthe oryzae</i>	rice blast	rice	High resolution mapping	RNAi & expression of the resistance gene	Fukuoka <i>et al.</i> , 2009
<i>PI35</i>	NBS-LRR	<i>Magnaporthe oryzae</i>	rice blast	rice	High resolution mapping	expression of the resistance gene	Fukuoka <i>et al.</i> , 2015b
<i>POQR</i>	prolyl oligopeptidase	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	white mold and stem rot	<i>Arabidopsis</i>	GWA mapping	Insertional mutants	Badet <i>et al.</i> , 2017
<i>RFO1/WAKL22</i>	wall associated-like kinase	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>matthioli</i>	wilt	<i>Arabidopsis</i>	Mapping	Insertional mutants & expression of the resistance gene	Diener and Ausubel, 2005
<i>RHG1</i>	copy number variation for an amino acid transporter, an α-SNAP protein, and a wound-inducible protein	<i>Heterodera glycines</i>	cyst nematode	soybean	High resolution mapping	amiR, RNAi and overexpression	Cook <i>et al.</i> , 2012
<i>RHG4</i>	serine hydroxy-methyl transferase	<i>Heterodera glycines</i>	cyst nematode	soybean	High resolution mapping	TILLING mutants, VIGS, RNAi & expression of the resistance gene	Liu <i>et al.</i> , 2016
<i>RKS1</i>	atypical kinase	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	black rot disease	<i>Arabidopsis</i>	High resolution mapping & nested GWA mapping	Insertional mutants, amiR & expression of the resistance gene	Huard-Chauveau <i>et al.</i> , 2013
<i>RPS4/ RRS1</i>	R gene pair: NBS-LRR and NBS-LRR-WRKY	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	black rot disease	<i>Arabidopsis</i>	nested GWA mapping	Insertional mutants	Debieu <i>et al.</i> , 2016
<i>YR36</i>	kinase with START domain	<i>Puccinia striiformis</i>	stripe rust	wheat	High resolution mapping	TILLING mutants (EMS) & of the resistance gene	Fu <i>et al.</i> , 2009
<i>ZmCCOAOMT2</i>	caffeoyl-CoA O-methyltransferase	<i>Cochliobolus heterostrophus</i> , <i>Cercospora zeae-maydis</i>	southern leaf blight, gray leaf spot	maize	High resolution mapping	Insertional mutants & expression of the resistance gene	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>ZmREM6.3</i>	remorin	<i>Setosphaeria turcica</i>	northern leaf blight	maize	High resolution mapping	Insertional mutants	Jamann <i>et al.</i> , 2016
<i>ZmWAK</i>	wall-associated kinase, non RD	<i>Sporisorium reilianum</i>	head smut	maize	High resolution mapping	RNAi & expression of the resistance gene	Zuo <i>et al.</i> , 2014

plantes sensibles. Chez les accessions résistantes, le champignon ne colonise pas le coléoptile, mais reste au niveau du mésocotyle. Il s'avère que la différence de niveau de résistance entre accessions s'explique seulement par une différence de niveau d'expression du gène *ZmWAK* au niveau du mésocotyle (il n'y a pas de différence d'expression significative au sein des autres tissus de la plante et le polymorphisme de séquence codante n'explique pas les différences observées) (Zuo *et al.*, 2014).

Un autre exemple de QDR lié à l'expression du gène de résistance dépendant du stade de développement de la plante est celui procuré par LR34 qui confère une résistance partielle à la rouille jaune (*Puccinia striiformis*), à la rouille noire (*Puccinia graminis*), à la rouille brune (*Puccinia tritricina*), et à l'oïdium blanc (*Blumeria graminis*) chez le blé. Cette résistance est observée chez les adultes (au niveau de la feuille drapeau) à 20°C et chez les plantules à basses températures (entre 4 et 8°C). Le locus LR34 a été isolé il y a plus de cinquante ans et est toujours efficace. Afin d'identifier le gène responsable de cette résistance, une approche de cartographie fine a été utilisée avec trois populations backcross. Cette étude a permis de réduire le QTL LR34 à une zone de 363 kB contenant huit gènes putatifs. Cette zone a ensuite été séquencée chez huit différents mutants sensibles à ces pathogènes (deux mutants obtenus par exposition aux rayons γ et six par traitement à l'azoture de sodium). Tous ces mutants présentaient des altérations de la séquence codante du transporteur ABC putatif (problème d'épissage, substitutions de nucléotides conduisant à des substitutions d'acides aminés et à l'apparition de codons stop). Le séquençage de la région contenant LR34 chez des cultivars sensibles et résistants a montré l'existence de trois différents polymorphismes de séquence qui pourraient expliquer cette différence de niveau de résistance car aucune différence du niveau d'expression du gène LR34 n'a été mise en évidence entre ces cultivars (Krattinger *et al.*, 2009).

Le dernier exemple présenté est celui du locus de résistance partielle à haute température (entre 25°C et 35°C) YR36 à *Puccinia striiformis* (rouille jaune) chez le blé (*Triticum aestivum*). Un clonage positionnel a été réalisé en utilisant une population issue du croisement entre la variété Langdon et la lignée isogénique RSL65 (lignée contenant YR36 et issue du fond génétique Langdon). Parmi les 4500 individus générés en F2, 121 lignées recombinantes entre les deux marqueurs flanquant le QTL ont été identifiées. Leur inoculation et génotypage à l'aide de nouveaux marqueurs a permis de réduire la QTL à deux couples de gènes candidats dupliqués. La comparaison des séquences génomiques des parents a permis de réduire le nombre de candidats à trois : *WKS1*, *WKS2*, et *IBR1* sont délétés chez le parent sensible Longdon. La validation fonctionnelle a ensuite été réalisée sur les gènes *WKS1* et *WKS2* car ces kinases à domaine START encodées par ces gènes avaient déjà été associées à la résistance au pathogène chez d'autres espèces dont la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Des mutants ont été recherchés dans ces deux gènes dans une collection de 1536 mutants EMS (méthanesulfonate d'éthyle) issus du fond génétique UC1041 (contenant le QTL YR36). Six mutants présentant un polymorphisme de séquence au sein des domaines décrits de *WKS1* et trois mutants dont les substitutions

ont conduit à l'apparition de codons stop prématurément dans *WKS2* ont été testés. Cinq des six lignées de mutants dans le gène *WKS1* ont montré une résistance plus faible à *Puccinia striiformis* que le témoin UC1041 contrairement aux trois mutants dans *WKS2* qui n'ont montré aucune différence significative de phénotypes. De plus, pour confirmer que *WKS1* était bien responsable de la résistance partielle à *Puccinia striiformis* chez le blé, la lignée sensible Bobwhite a été transformée avec un fragment de 12,2kb contenant la séquence codante de *WKS1* et sa région promotrice. Les deux lignées transgéniques exprimant le transcrit entier de *WKS1* sont résistantes à *Puccinia striiformis* (Fu *et al.*, 2009). Le gène *WKS1* (Wheat Kinase-Start 1) encode une protéine kinase à domaine START, domaine jouant un rôle dans la liaison des lipides et dans le métabolisme chez l'homme mais mal caractérisé chez le végétal (French *et al.*, 2016).

b. QDR par haut niveau d'expression des gènes de résistance

Les gènes *RHG1*, *RKS1*, *POQR*, *CYP82G1*, *ZmCCOAOMT2* et *ZmREM6.3* confèrent une QDR grâce à de hauts niveaux d'expression chez les accessions résistantes. Ainsi, chez *Glycine max*, le QTL de résistance au nématode du kyste du soja (*Heterodera glycines*) *RHG1* d'une longueur de 67 kb est composé de onze gènes candidats dont trois gènes très liés encodant un transporteur d'acide aminé, une protéine α -SNAP participant à la dégradation des complexes SNARE (Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor, protéines impliquées dans la fusion membranaires des vésicules) des membranes et une protéine non caractérisée possédant un domaine WI12 (wound-inducible protein 12). La réduction de l'expression racinaire d'un de ces trois gènes chez des plantes chimériques aux racines transgéniques et issues du fond génétique résistant Fayette par amiR ou ARN interférent a montré une augmentation de l'infection par *Heterodera glycines*. De plus, cette diminution de la résistance à ce nématode est proportionnelle au niveau de la réduction de l'expression d'un de ces trois gènes chez ces plantes aux racines transgéniques. Au contraire, la surexpression de ces trois gènes simultanément (transcrit de l'accession Fayette) grâce à un promoteur constitutif 35S chez des plantes aux racines transgéniques issues du fond génétique Fayette augmente la résistance aux nématodes du soja. De plus, l'étude de quatre lignées résistantes a montré qu'un fragment de 31,2 kb contenant ces gènes existait en plusieurs copies au sein de chacun des génomes alors qu'il était complètement absent des lignées sensibles. Le niveau d'expression et le nombre de copies de ces gènes expliquent cette QDR chez le soja (Cook *et al.*, 2012).

Chez *Arabidopsis thaliana*, un QTL de résistance à *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (responsable de la maladie de la nervation noire des crucifères) *QRX3* a été identifié chez la population de RILs Col-5 (résistant) x Kas-1 (sensible). Un clonage positionnel en utilisant une carte génétique à haute densité a permis de diminuer la taille du QTL afin de réduire à dix-sept le nombre de gènes

candidats à la résistance à *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. L'utilisation de mutants d'insertion dans ces gènes candidats et issus du fond génétique résistant Col-0 a montré que seuls les mutants au sein du gène *RKS1* montraient un phénotype sensible. La validation fonctionnelle de ce gène a ensuite été poursuivie par transformation génétique stable en réduisant l'expression du gène *RKS1* par amiR chez la lignée Col-0 et chez des individus résistants de la population Col-5 x Kas-1. Le gène *RKS1* de la lignée résistante Col-0 (avec son promoteur d'origine) a également été exprimé chez Kas-1 et des individus sensibles de la population Col-5 x Kas-1. De plus, une étude de génétique d'association a également été réalisée au sein de populations naturelles d'*Arabidopsis thaliana* et a mis en évidence le fait que *RKS1* était la principale source de résistance à *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* chez cette espèce. *RKS1* encode une kinase atypique puisqu'elle ne possède pas certains des résidus nécessaires à la fonction catalytique des kinases. Pour finir, il existe un épissage alternatif de *RKS1* qui encode deux transcrits, un long et un court. L'étude de l'expression de ces deux transcrits a montré que chez les accessions résistantes le transcrit long est plus exprimé que le transcrit court alors qu'à l'inverse, chez les lignées sensibles, le transcrit court est plus exprimé que le transcrit long (le transcrit long est 235 fois plus exprimé chez les accessions résistantes que chez les accessions sensibles). Ce haut niveau d'expression du transcrit long de *RKS1* est donc responsable de la résistance partielle à *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* chez *Arabidopsis thaliana* (Huard-Chauveau *et al.*, 2013).

Chez *Arabidopsis thaliana*, une étude de génétique d'association a été conduite sur 84 accessions européennes afin de mettre en évidence des gènes candidats à la résistance à *Sclerotinia sclerotiorum*, pathogène responsable de la sclérotiniose ou pourriture blanche. La plus significative des *P-values* obtenues correspond à un SNP localisé sur le chromosome 1 dans la séquence codante du gène *At1g20380*. Ce gène nommé *POQR* (Prolyl-Oligopeptidase associated with Quantitative Resistance) encode une prolyl-oligopeptidase qui n'avait pas encore été caractérisée. La validation fonctionnelle de ce gène a été effectuée en utilisant deux mutants d'insertion issus du fond génétique Col-0 : ces deux lignées ont montré une plus grande sensibilité à *Sclerotinia sclerotiorum* que l'accession sauvage Col-0. De plus, l'inoculation de Col-0 par *Sclerotinia sclerotiorum* induit l'expression de *POQR* alors que ce n'est pas le cas chez les lignées mutantes (Badet *et al.*, 2017).

D'autres gènes de résistance quantitative décrits chez *Arabidopsis thaliana* concernent la résistance à *Alternaria brassicae*, agent pathogène causant la maladie des tâches noires. Une analyse de génétique d'association a été réalisée sur une collection de 123 accessions naturelles, puis les auteurs ont choisis de conserver 1% des *P-values* les plus significatives, soit environ 2000 SNPs. Cela leur a permis d'identifier 104 gènes candidats à la résistance à *Alternaria brassicae*. Parmi ces 106 gènes candidats, une annotation fonctionnelle ainsi que l'étude de leurs profils d'expression dans diverses conditions de stress biotiques et abiotiques ont permis de réduire à seize le nombre de candidats. Les auteurs ont ensuite réalisé une validation fonctionnelle en utilisant des mutants d'insertion issus du fond

génétiq ue Col-0 : des lignées mutantes dans six des seize gènes candidats ont été identifiées. L'analyse des phénotypes de maladies des mutants par rapport au témoin Col-0 a mis en évidence le rôle des gènes At3g25180 (*CY82G1*, cytochrome P450 monooxygenase), At5g37500 (*GORK*, guard cell outward rectifying K⁺ channel) et At1g06990 (*GDSL*, GDSL-motif esterase/acyltransferase/lipase) dans la résistance à *Alternaria brassicae*. De plus, il s'avère que le gène *CY82G1* est surexprimé chez l'accension résistante CIBC-5 alors qu'il est réprimé chez la lignée sensible Zdr1 quatre jours après inoculation par *Alternaria brassicae*. Cette différence de niveau d'expression du gène *CY82G1* entre accessions sensibles et résistantes s'accompagne également de huit substitutions non-synonymes entre lignées résistantes et sensibles dans un panel composé de vingt lignées (dix sensibles et dix résistantes). Les auteurs de cette étude n'excluent donc pas non plus le rôle d'une modification ou perte de fonction de cette protéine dans la résistance à *Alternaria brassicae*. En ce qui concerne les deux autres gènes impliqués dans cette résistance chez *Arabidopsis thaliana*, les auteurs de cette étude n'ont pas émis d'hypothèse quant à leur fonction dans cette résistance quantitative (Rajarammohan *et al.*, 2018).

Chez le maïs (*Zea mays*), deux gènes impliqués dans des résistances quantitatives aux pathogènes grâce à leur haut niveau d'expression ont été identifiés. Le QTL qMdr_{9.02} confère notamment des résistances quantitatives à *Cochliobolus heterostrophus* (helminthosporiose) et *Cercospora zeaemaydis* (maladie des tâches grises ou cercosporiose). L'identification de gènes candidats à ces résistances a été réalisée par cartographie fine, en générant une population de NIL (near-isogenic line) à partir d'un back-cross de NC292 (parent possédant le QTL) dans B73. Puis l'évaluation des individus recombinants entre les marqueurs PZA02344 et PZA03416, marqueurs flanquant le QTL a permis de réduire la taille de qMdr_{9.02} à 100 kb et quatre gènes candidats : *ZmPIF* (gène encodant une PIF/Ping-Pong family plant transposase), *ZmFBXL* (gène encodant une protéine à domaines F-box et riche en leucine), *ZmCCOAOMT2* (encodant une coffeoyl-CoA O-methyltransferase) et *ZmRLK* (codant pour une S-locus receptor-like protein kinase). Les auteurs de cette étude ont ensuite poursuivi leurs travaux sur les gènes *ZmFBXL*, *ZmRLK* et *ZmCCOAOMT2* car certains de leurs orthologues jouent des rôles dans les défenses immunitaires des plantes. L'analyse de l'expression de ces gènes après inoculation par *Cochliobolus heterostrophus* a montré que seule l'expression de *ZmCCOAOMT2* était induite chez les accessions résistantes et sensibles. De plus, cette induction est plus rapide chez les accessions résistantes aux stades précoces de l'inoculation (entre 0 et 24 heures), le niveau d'expression de *ZmCCOAOMT2* entre lignées sensibles et résistantes est ensuite identique 48 heures après inoculation. La validation fonctionnelle a consisté à évaluer la réponse à *Cochliobolus heterostrophus* et à *Cercospora zeaemaydis* de deux lignées mutantes d'insertion *Mu* (transposon *Mutator*) dans la région 3'-UTR de ce gène et à surexprimer *ZmCCOAOMT2* dans des plantes transgéniques. Dans ces deux cas, une augmentation de la résistance aux pathogènes a été observée. Etant donnée que l'un des variants

expliquant une des plus grandes parts de la variation de la résistance à *Cochliobolus heterostrophus* se situe au niveau de la région 3'-UTR de *ZmCCOAOMT2*, les auteurs de cette étude ont émis l'hypothèse que l'accumulation des ARNm de *ZmCCOAOMT2* pourrait s'expliquer par une modification de cette région génomique. Cette hypothèse explique également l'augmentation de la résistance des lignées d'insertion *Mu*. En ce qui concerne le rôle de *ZmCCOAOMT2*, l'étude des métabolites secondaires par chromatographie à phase liquide couplée à de la spectrophotométrie de masse après inoculation a mis en évidence une présence de seize métabolites secondaires plus abondants chez les individus résistants. Parmi ces métabolites, la lignine et son précurseur la coniférine sont accumulées conformément à son rôle attendu dans la voie de synthèse des phénylpropanoïdes. Cette accumulation conférerait une résistance en renforçant les parois cellulaires. Pour conclure cette étude, les auteurs n'excluent pas un rôle des gènes *ZmPIF*, *ZmFBXL* et *ZmRLK* dans la QDR à *Cochliobolus heterostrophus* et à *Cercospora zea-maydis* puisqu'aucune validation fonctionnelle n'a été réalisée sur ces gènes (Yang *et al.*, 2017).

Le gène *ZmREM6.3* est impliqué dans la résistance à *Setosphaeria turcica* (Helminthosporiose) chez le maïs. Par cartographie fine, le QTL *qNLB1.02_{B73}* (Northern leaf blight) de résistance à *Setosphaeria turcica* a été réduit à une taille de 243 kb correspondant à quinze gènes candidats. Les auteurs de cette étude ont ensuite focalisé leur étude sur les gènes situés dans un intervalle de 22 kb, intervalle où les LOD scores étaient les plus élevés ainsi qu'au niveau d'une délétion entre le parent sensible Tx303 et le parent résistant B73. Ces six gènes comportent un pentricopeptide putatif (*GRMZM2G107805*), une chaperonine putative (*GRMZM2G069765*), trois gènes non annotés (*GRMZM2G070442*, *GRMZM2G107727* et *GRMZM2G523621*) et une rémorine putative (*GRMZM2G107774*). Une étude de leur expression 72 heures après inoculation par *Setosphaeria turcica* a montré un niveau d'expression très faible pour les gènes non caractérisés. Le gène encodant la chaperonine est exprimé indifféremment dans les lignées sensibles et résistantes en condition inoculée ou non inoculée. Le gène *GRMZM2G107774* ou *ZmREM6.3* a un niveau d'expression plus élevé chez la lignée résistante en condition témoin et inoculée. La validation fonctionnelle des gènes candidats a ensuite été réalisée en utilisant des lignées mutantes d'insertion *Mu* dans les gènes ou à proximité des gènes candidats *GRMZM2G107805*, *GRMZM2G069765* et *GRMZM2G107774*. Seul le mutant *Mu* dans le gène *ZMREM6.3* présente un niveau de résistance différent de celui du témoin, il est plus sensible à *Setosphaeria turcica*. Les rémorines sont connues chez les plantes pour jouer un rôle dans la régulation de la taille limite d'exclusion des peptides à travers les plasmodesmes et peuvent également physiquement interagir avec les protéines de mouvement virales et les récepteurs kinases. Sachant qu'il avait déjà été montré que le QTL *qNLB1.02_{B73}* empêchait la pénétration du pathogène dans le système vasculaire, les auteurs de ces travaux ont émis l'hypothèse que la protéine *ZmREM6.3* entraverait les mouvements fongiques d'une cellule végétale à l'autre (Jamann *et al.*, 2016).

Chez le blé (*Triticum aestivum*), le QTL *Fhb1* situé sur le chromosome 3BS d'une longueur de 0,08 cM confère une résistance à *Fusarium graminearum* (agent pathogène causant la fusariose). Le séquençage de ce QTL chez la variété résistante Sumai 3 a mis en évidence treize gènes candidats. L'expression de ces treize gènes a ensuite été étudiée entre individus sensibles et résistants appartenant à une population de NILs se différenciant par la présence ou l'absence de *Fhb1*. Seuls les gènes *PFT* (encodant une protéine à domaines agglutinines et ETX/MTX2) et *NBA* (encodant une protéine à domaine Nb-ARC) sont exprimés dans les NILs résistants et non exprimés dans les NILs sensibles. L'hypothèse de l'implication probable d'homologues de ces gènes dans les défenses végétales ayant déjà été émise, les auteurs de ces travaux ont sélectionné ces deux gènes candidats pour la suite de leur étude. Puis, l'analyse de la séquence codante du gène *NBA* chez plusieurs cultivars a révélé que des cultivars sensibles ne possédant pas le QTL *Fhb1* possédaient un gène *NBA* identique à Sumai 3, cultivar résistant. Ainsi le gène *NBA* a également été exclu de la suite de cette étude. La validation fonctionnelle du gène *PFT* a été réalisée en utilisant des mutants TILLING, des ARNs interférents, et l'expression de ce gène chez un cultivar sensible. Les mutants TILLING, et les plantes transformées avec l'ARN interférent ciblant *PFT* se sont révélés plus sensibles à *Fusarium graminearum* alors que les plantes exprimant *PFT* sont plus résistantes que les plantes témoins. L'expression du gène *PFT* confère donc une résistance quantitative à *Fusarium graminearum*. Ce gène encode une protéine lectine chimérique à deux domaines agglutinines (domaines de liaison aux carbohydrates) et un domaine ETX/MTX2 (toxine bactérienne). Les auteurs de cette étude ont émis l'hypothèse que la spécificité des domaines lectines permettrait une reconnaissance de carbonhydrates fongiques et que le domaine ETX/MTX2 serait toxique pour le pathogène (Rawat *et al.*, 2016).

c. QDR résultant de kinases associées aux parois cellulaires (WAKs)

Chez le maïs, en plus de *ZmWAK*, une autre protéine kinase associée aux parois cellulaires est impliquée dans une QDR : *ZmWAK-RLK1* confère une résistance partielle à *Exserohilum turcicum*, champignon hémibiotrophe responsable de l'helminthosporiose fusiforme. Le QTL *HTN1* responsable de cette résistance a pu être réduit à 1,3 Mb par cartographie génétique à haute densité en utilisant une population F₂ issue du croisement d'un parent résistant RP1-HTN1 et d'un parent sensible RP1. Les trois gènes candidats dans cette portion de génome encodent deux WAKs (*ZmWAK-RLK1* et *ZmWAK-RLK2*) ainsi qu'une autre protéine associée aux parois cellulaires sans domaine kinase cytoplasmique (*ZmWAK-RLP1*). Le rôle des WAKs dans la résistance aux pathogènes ayant déjà été démontré, les gènes *ZmWAK-RLK1* et *ZmWAK-RLK2* ont été choisis pour poursuivre cette étude. Leur validation fonctionnelle a été réalisée en développant une population de dix mille mutants TILLING à partir d'une accession résistante RP3-HTN1. L'analyse des phénotypes de maladie de trois lignées mutées au niveau de la séquence codante de *ZmWAK-RLK2* par rapport à l'accession résistante RP3-

HTN1 n'a montré aucune différence significative. Par contre, trois des quatre mutants possédant un gène *ZmWAK-RLK1* altéré ont montré une plus grande sensibilité à *Exserohilum turcicum*. Le séquençage du gène *ZmWAK-RLK1* chez la lignée résistante RP1-HTN1 et la lignée sensible RP1 a montré que le domaine kinase des deux lignées était à 98% identique. En revanche, les domaines extracellulaires possédaient moins de 80% d'homologie. De plus, *HTN1* n'est pas induit après inoculation par *Exserohilum turcicum* ni chez la lignée sensible, ni chez la lignée résistante. Ces résultats ont conduit les auteurs à émettre l'hypothèse que le polymorphisme du domaine extracellulaire était la cause de la différence de niveau de résistance entre ces deux lignées (Hurni *et al.*, 2015).

Chez *Arabidopsis thaliana*, le gène *WAKL22* encodant une protéine kinase associée aux parois cellulaires confère une résistance à *Fusarium oxysporum* sp. *matthioli* (pathogène responsable de la fusariose). Six QTLs ont été identifiés chez *Arabidopsis* dans une population de RILs issues du croisement entre Col-0 (résistant) et Ty-0 (sensible). Le QTL majeur *RF01* contenait 108 gènes candidats putatifs, dont six ont alors été considérés comme de bons candidats à la résistance à *Fusarium oxysporum* sp. *matthioli* car ils possédaient des domaines homologues à des gènes de résistance déjà connus (domaines kinases et LRRs). Les mutants d'insertion issus du fond génétique Col-0 dans le gène *WAKL22* ont montré une plus grande sensibilité à la fusariose que Col-0. Les plantes issues du fond génétique TY-0 et exprimant le gène *WAKL22* sont plus résistantes que les plantes témoins. De plus, la résistance apportée par *WAKL22* est plus importante lorsque les QTLs *RF02*, *RF04* ou *RF06* sont aussi présents au sein de la plante, suggérant un effet d'interaction entre ces protéines dans le cadre de cette QDR (Diener and Ausubel, 2005).

d. QDR résultant de formes altérées de gènes NB-LRR

D'autres sources de résistance *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ont été recherchées chez *Arabidopsis thaliana* en utilisant d'autres races de ce pathogène et en utilisant une approche de génétique d'association nichée. *RKS1* conférant une QDR aux races 1, 3, 5, 7 et 9 de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, des souches de race 2 et 6 ont été sélectionnées, et la réponse à la maladie de 380 accessions naturelles a été évaluée. L'étude de génétique d'association sur l'ensemble des individus inoculés par la souche de race 2 Xcc12824 a mis en évidence un premier gène candidat, *At5g22540* codant pour une protéine de fonction inconnue. Puis, l'étude de génétique d'association réalisée sur les individus possédant le SNP sensible du gène *At5g22540* a mis en évidence un second gène candidat à la résistance : *At5g22510* (gène encodant une invertase alcaline/neutre). L'étude des phénotypes des mutants d'insertion dans ces deux gènes a mis en évidence le rôle d'*At5g22540* dans la résistance à *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* race 2. En ce qui concerne la résistance quantitative à *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* race 6, et selon la même approche méthodologique,

le gène candidat *RPS4* (*Resistance to Pseudomonas syringae* 4) a été mis en évidence. De plus, *RPS4* ayant déjà été décrit comme coopérant génétiquement et moléculairement avec *RRS1* (*Resistance to Ralstonia solanacearum* 1), le rôle de *RRS1* dans cette QDR a également été étudié. La validation fonctionnelle de ces deux candidats a été effectuée en utilisant des mutants d'insertion : les mutants dans les gènes *RPS4*, *RRS1* et les doubles mutants dans les gènes *RPS4* et *RRS1*. Ils montrent tous une plus grande sensibilité à *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* race 6 que le témoin. Il est intéressant de noter que ces deux gènes ont déjà été décrits pour leur rôle dans des ETI : *RPS4* confère une résistance aux souches de *Pseudomonas syringae* sécrétant l'effecteur AvrRPS4 et *RRS1* provoque une résistance aux souches de *Ralstonia solanacearum* sécrétant l'effecteur POPP2. Des mécanismes de résistance sont donc communs à l'ETI et à la QDR (Debieu *et al.*, 2016).

Le second exemple de variation de gène NB-LRR concerne la résistance à la pyriculariose (*Magnaporthe oryzae*) chez le riz (*Oryza sativa*). Il existe plus de 90 gènes issus de différents cultivars ayant été décrits comme impliqués dans la résistance qualitative ou quantitative à *Magnaporthe oryzae*. Dans le cas des résistances qualitatives race spécifique, la plupart des gènes identifiés sont des NB-LRRs. *PI35* est un des QTLs conférant une résistance à *Magnaporthe oryzae*, et une cartographie à haute densité a permis d'identifier huit gènes candidats. La comparaison de cette portion de 59,2 kb entre cultivars sensibles et résistants a conduit à réduire le nombre de candidats à un unique gène. La validation de ce gène a été réalisée par transformation génétique en l'exprimant dans un cultivar sensible. Il s'avère que le gène du QTL *PI35* correspond au gène *PISH*, gène NB-LRR impliqué dans la résistance qualitative race spécifique à la pyriculariose (souche kyu77-07A). Contrairement à *PISH*, l'allèle *PI35* confère une résistance modérée à différentes races du pathogène. Les protéines *PI35* et *PISH* présentent des différences dans leurs domaines NBs et LRRs. Les tests de pathogénicité réalisés sur des individus exprimant des protéines chimériques (modification des domaines NB et LRR des protéines natives *PI35* et *PISH*) ont mis en évidence le rôle crucial du domaine LRR de ces protéines dans les mécanismes de résistances quantitatives et qualitatives (Fukuoka *et al.*, 2015b). Dans cet exemple, un même locus est responsable de différents types de résistance.

e. QDR basée sur les récepteurs PRRs

Les PRRs qui permettent la perception des pathogènes dans le cadre de la MTI peuvent aussi jouer un rôle dans la résistance quantitative. Ainsi, les différents niveaux d'expression du gène codant *FLS2* (Flagellin Sensing 2), récepteur PRR de la flagelline bactérienne flg22, varient quantitativement en fonction des différents écotypes *Arabidopsis thaliana*. Les niveaux de liaison entre flg22 et *FLS2* dépendent également des génotypes et sont positivement corrélés à la quantité de récepteurs *FLS2* présents. L'augmentation de liaison entre flg22 et son récepteur est négativement corrélée à la

colonisation de la plante par *Pseudomonas syringae*, suggérant ainsi une QDR (Vetter *et al.*, 2012). De plus, *FLS2* a également été identifié dans la résistance à *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolica* dans une population de RILs d'*Arabidopsis thaliana* (Forsyth *et al.*, 2010).

Le récepteur EFR (Elongation Factor Tu Receptor) exclusivement présent chez les brassicacées reconnaît le peptide bactérien EF-Tu. Lorsqu'il est introduit chez *Nicotiana benthamiana* et *Solanum lycopersicum*, il confère une résistance à spectre large à *Ralstonia solanacearum* et *Xanthomonas perforans* (Lacombe *et al.*, 2010).

f. QDR résultant d'une perte de fonction d'un allèle de sensibilité

Parmi les QTLs identifiés chez le riz en réponse à la pyriculariose, *pi21* a été utilisé pendant plus d'un siècle dans des variétés japonaises de riz pour sa résistance durable à de multiples races de *Magnaporthe oryzae* : chez les accessions portant ce QTL, le pathogène pénètre dans les cellules mais ne se propage pas dans les cellules adjacentes, et les premiers signes de HR sont visibles à partir de 96h après inoculation, soit dans un délai plus long que dans l'ETI classique (la HR peut-être activée en 15 minutes, et visible en 2 à 3 heures (Johansson *et al.*, 2015)). Une cartographie à haute résolution a permis d'identifier le gène *pi21*. Il s'agit d'une protéine riche en proline qui pourrait avoir un rôle dans le transport des métaux. Il est intéressant de noter que la transformation du cultivar sensible avec l'allèle du cultivar résistant ne restaure pas la résistance à *Magnaporthe oryzae*. En revanche, la transformation du cultivar résistant avec l'allèle sensible augmente la sensibilité de la plante hôte. Cela suggère que *pi21* est un allèle de sensibilité et que la résistance est conférée par une perte de fonction de cet allèle récessif. De plus, la comparaison des séquences de ce gène chez douze cultivars a mis en évidence une délétion dans le domaine d'interaction protéine/protéine chez tous les cultivars résistants. Cela suggérerait que la perte de ce domaine ne permettrait plus la reconnaissance des facteurs de virulence du pathogène par la plante, conduisant ainsi à la résistance de la plante hôte (Fukuoka *et al.*, 2009).

g. QDR résultant d'une modification du métabolisme de l'hôte

En plus de *RGH1*, une autre source de résistance au nématode du kyste du soja (*Heterodera glycines*) a été identifiée chez le soja : *RGH4*. Une cartographie à haute densité a permis de déterminer que *RGH4* encodait une sérine hydroxyméthyletransférase. Cette enzyme joue un rôle déterminant dans le métabolisme des folates C₁ dépendants, notamment en catalysant la réaction réversible entre les sérines et tétrahydrofolates en glycine et 5,10 méthylène-tétrahydrofolates. Ce métabolisme est très important pour le développement des cellules nourricières (syncytia) des nématodes. Une

modification de ce métabolisme chez l'hôte provoque donc des perturbations du cycle de développement du nématode. La comparaison des séquences du gène *RGH4* entre lignées sensibles et résistantes a montré une modification de cinq acides aminés. Néanmoins, ces deux types d'enzymes sont toujours fonctionnelles *in vitro*. La seule différence observée réside dans une modification des propriétés cinétiques de ces deux enzymes, ce qui pourrait conduire à une modification de la fonction *in planta* de l'enzyme (Liu *et al.*, 2016).

Chez le blé (*Triticum aestivum*), le QTL *LR67* situé sur le chromosome 4DL confère une résistance partielle à *Puccinia striiformis* (rouille jaune), *Puccinia tritricina* (rouille brune), *Puccinia graminis* (rouille noire) et *Blumeria graminis* (oïdium). A partir de la population de NILs RL6077 (cultivar Thatcher+*LR67*), des mutants TILLING obtenus par radiation γ ou exposition à l'EMS (méthanesulfonate d'éthyle) ont été générés. Puis, la résistance aux différentes rouilles et à l'oïdium des lignées possédant des mutations au sein du QTL *LR67* a été évaluée. Parmi les sept lignées de mutants, γ 1183 présentait la plus petite délétion au sein du QTL *LR67*, réduisant ainsi la taille du QTL à trois gènes candidats *PIP* (potyvirus interacting protein), *STP* (predicted sugar transporter) et *HSP70* (heat-shock protein gene). De plus, les lignées sensibles γ 318, γ 1239, *emsSu1* et *emsSu2* présentaient toutes uniquement des mutations au sein du gène *STP*. L'implication de ce gène candidat dans la résistance à ces pathogènes a ensuite été confirmée par transformation génétique d'un cultivar de blé initialement sensible à la rouille jaune devenu plus résistant. De plus, l'insertion du gène *STP* chez l'orge (*Hordeum vulgare*) confère une résistance à la rouille naine (*Puccinia hordei*). Le gène *STP* encode une protéine transmembranaire facilitant le transport des hexoses à travers la membrane plasmique. Au sein de la population de NILs, l'allèle sensible de *STP* présente un polymorphisme de deux acides aminés par rapport à l'allèle résistant. L'expression des deux allèles de *STP* chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* a permis de mettre en évidence une diminution de la fonction de la protéine encodée par l'allèle résistant : il y a peu de transport transmembranaire d'hexoses contrairement à la protéine codée par l'allèle sensible. Selon les auteurs de cette étude, l'accumulation d'hexoses dans l'apoplasme foliaire induirait une réponse immunitaire résultant en un environnement hostile pour le pathogène (Moore *et al.*, 2015).

h. Durabilité et sélection variétale de la QDR

La durabilité de la QDR par rapport aux gènes R est souvent évoquée comme argument par les sélectionneurs. Néanmoins, peu d'études ont vérifié cette hypothèse et les résultats varient en fonction des pathosystèmes étudiés. Ainsi, la résistance quantitative du cultivar Vada (*RPH7*) de l'orge (*Hordeum vulgare*) à la rouille brune (*Puccinia hordei*) est restée efficace pendant plusieurs décennies en Europe (Niks *et al.*, 2000). En revanche, chez la pomme de terre (*Solanum tuberosum*), des isolats

locaux de *Phytophthora infestans* (mildiou) montrent une adaptation aux QRLs (quantitative resistance loci) présents chez les variétés les plus cultivées. En effet, des isolats de *Phytophthora infestans* provenant de France et du Maroc ont été testés sur deux cultivars Bintje (variété non cultivée au Maroc mais très populaire en France et sensible au mildiou en Europe) et Désiré (variété cultivée au Maroc, mais très peu en France, partiellement résistante au mildiou en Europe). Les isolats marocains se sont avérés beaucoup plus virulents que les isolats français sur le cultivar Désiré et moins virulents sur le cultivar Bintje. Ces données ont permis de mettre en évidence le fait que les populations de *Phytophthora infestans* s'adaptent localement au cultivar dominant (Andrivon *et al.*, 2007).

Une des nouvelles stratégies de sélection aujourd'hui consiste à combiner différents QTLs ou encore à allier QTLs et gènes de résistance qualitative au sein d'un même cultivar tout en conservant des traits agronomiques d'intérêt tel que le rendement par exemple (stratégie du pyramidage). Là encore, le succès de ces stratégies dépend des pathosystèmes et des QTLs identifiés. Par exemple, différents couples des QTLs de résistance à la pyriculariose *PI21*, *PI34* et *PI35* ont été associés chez le riz. Suite à ces combinaisons, deux phénotypes ont été observés : soit l'association permettait d'obtenir un meilleur niveau de résistance à *Magnaporthe oryzae*, soit un niveau de résistance équivalent à celui du QTL ayant l'effet le plus important. Les auteurs de cet article ont émis l'hypothèse que les différences d'expression spatio-temporelle entre ces QTLs pourraient expliquer le fait qu'il n'y ait aucun gain de résistance par l'ajout d'un second QTL (Yasuda *et al.*, 2015). Toujours dans le cadre de la résistance à la pyriculariose, différentes combinaisons des QTLs *pi21*, *PI34*, *qBR4-2*, et *qBR12-1* provenant du cultivar résistant Owarihatamochi ont été introgressées dans le cultivar sensible Aichiasah. Dans cette étude, les auteurs ont montré que l'introgression de multiples QTLs dans le cultivar sensible Aichiasah provoquait une augmentation du niveau de résistance à *Magnaporthe oryzae* et que ce niveau de résistance était positivement corrélé au nombre de QTLs introgressés dans le nouveau cultivar (Fukuoka *et al.*, 2015a). La durabilité de la résistance à *Leptosphaeria maculans* (causant la nécrose du collet) chez le colza (*Brassica napus*) a été testée en champs dans le cadre d'une combinaison QTLs et gène de résistance qualitative. Pour cela, le gène de résistance *RLM6* a été introgressé dans deux cultivars, l'un possédant une résistance quantitative à *Leptosphaeria maculans*, et l'autre ne présentant pas de résistance quantitative à ce pathogène. L'étude a ensuite été conduite pendant cinq années consécutives en champ en inoculant chaque année les quatre lignées de colza avec des populations de *Leptosphaeria maculans* réisolées l'année précédente sur des résidus de cultures de ces quatre génotypes. Au bout de la troisième année, la résistance conférée par le gène *RLM6* seul a été contournée alors qu'au bout de la cinquième année, la résistance du génotype portant le gène *RLM6* et le QTL n'avait pas été détournée. Aucune variation de niveau de résistance de la lignée ne portant que le QTL n'a été observée au cours de ces essais. D'après les auteurs, la combinaison de gènes de résistance R et de QTL améliorerait le contrôle de cette maladie chez le colza (Brun *et al.*, 2010).

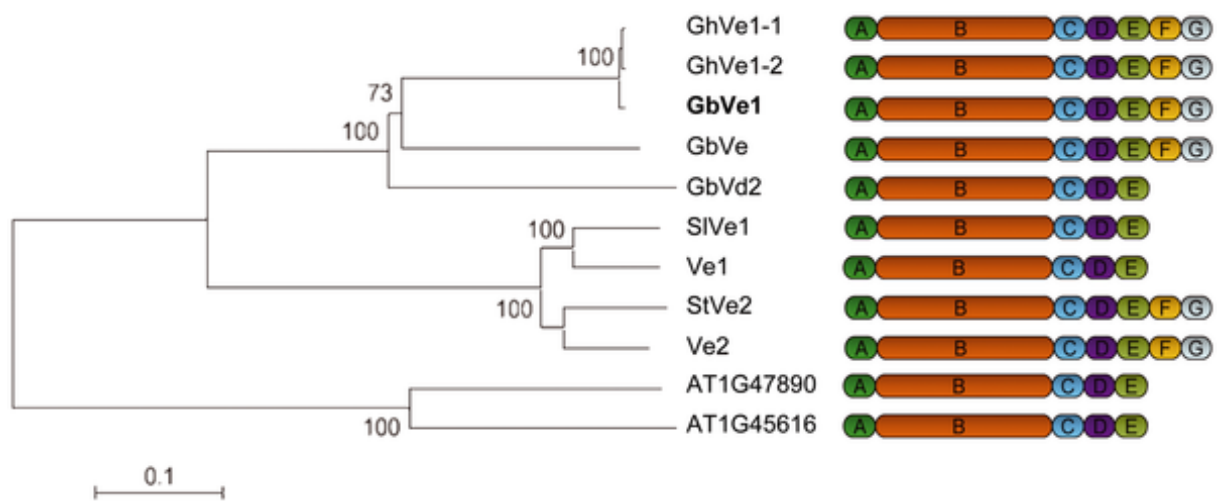


Figure A-21 : Exemples d'une analyse phylogénétique et structurale des gènes *VE* et d'homologues à *VE* (extrait de Zhang *et al.*, 2012).

Le domaine A est un signal peptide prédit. Le domaine B est constitué majoritairement de LRR. Le domaine hydrophobique associé aux membranes D est flanqué par un domaine C riche en acides aminés neutres et acides et par un domaine E riche en acides aminés neutres et basiques. Le domaine F contient la séquence PEST et le domaine G un signal d'endocytose. Les gènes *GhVe-1*, *GhVe-2* proviennent de *Gossypium hirsutum*, les gènes *GbVe1*, *GbVe*, et *GbVd2* de *Gossypium barbense*, le gène *SlVe1* de *Solanum lycopersicoides*, le gène *StVe2* de *Solanum torvum* et les gènes *AT1G47890* et *AT1G45616* d'*Arabidopsis thaliana*.

3. Mécanismes génétiques connus de résistances à la verticilliose

a. Résistance qualitative

A ce jour, la résistance qualitative à la verticilliose la plus étudiée a été identifiée chez la tomate *Lycopersicon esculentum* : il s'agit du locus de résistance dominant *VE* conférant une résistance totale aux souches de *Verticillium dahliae* et *albo-atrum* de race 1. La race 1 de ces espèces correspond aux souches dont la résistance est contrôlée par ce locus, par défaut les autres espèces appartiennent à la race 2 (Schaible *et al.*, 1951; Fradin *et al.*, 2011). Un clonage positionnel a permis de déterminer que ce locus est constitué des deux gènes liés et inversés *VE1* et *VE2*. *VE1* et *VE2* sont toutes les deux des protéines de type récepteur à domaine extracellulaire riche en leucine (eLRR-RPLs : extracellular leucine-rich repeat of receptor-like proteins) possédant un signal d'endocytose cytoplasmique en C-terminal (**Figure A-21**). La partie N-terminale de *VE1* possède un domaine de type fermeture à leucine alors que celle de *VE2* est constituée d'un motif Pro-Glu-Ser-Thr associé à un motif dilysine caractéristique de protéines à courte durée de vie et localisées dans le réticulum endoplasmique des cellules des mammifères et des plantes (Kawchuk *et al.*, 2001; Ruthardt *et al.*, 2007).

L'analyse d'expression des gènes *VE* dans les racines, les tiges et les feuilles de cultivars de tomate sensibles et résistants aux souches de *V. dahliae* de race 1 a montré une augmentation de l'expression de *VE1* et *VE2* après inoculation chez les cultivars sensibles et résistants (Fradin *et al.*, 2009). Une analyse des séquences codantes des gènes *VE1* et *VE2* chez des cultivars sensibles et résistants a mis en évidence que seule la protéine *VE1* était différente entre sensibles et résistants : les cultivars sensibles possèdent une protéine *VE1* tronquée causée par une délétion d'un nucléotide et provoquant l'apparition prématurée d'un codant stop (407 acides aminés au lieu de 1 053 acides aminés). Pour confirmer cette hypothèse, une extinction des gènes *VE* a été réalisée par VIGS (Virus-Induced Gene Silencing) chez le cultivar résistant Motelle. Seule l'extinction de *VE1* provoque la sensibilité de ce cultivar. La surexpression stable de *VE1* chez le cultivar sensible MoneyMaker le rend résistant. Ces résultats montrent que seul *VE1* gouverne la résistance à *Verticillium dahliae* et *Verticillium albo-atrum* race 1 chez la tomate (Fradin *et al.*, 2009).

Pour identifier l'effecteur AVE1 (Avirulence on *VE1* tomato) interagissant avec le récepteur *VE1*, un séquençage de dix souches de *V. dahliae* (six de race 2 et quatre de race 1) a été réalisé (de Jonge *et al.*, 2012). La totalité des contigs et scaffolds obtenus a été alignée par rapport au génome de référence de *V. dahliae* race 2 souche VdLs17 afin de ne conserver que les séquences d'ADNg propres aux souches de race 1. Après comparaison des séquences spécifiques aux souches *V. dahliae* race 1, une seule région d'une longueur de 50kb contenant dix effecteurs hypothétiques est conservée. L'inoculation de *Nicotiana benthamiana* par *V. dahliae* race 1 souche JR2 puis le séquençage des ARN

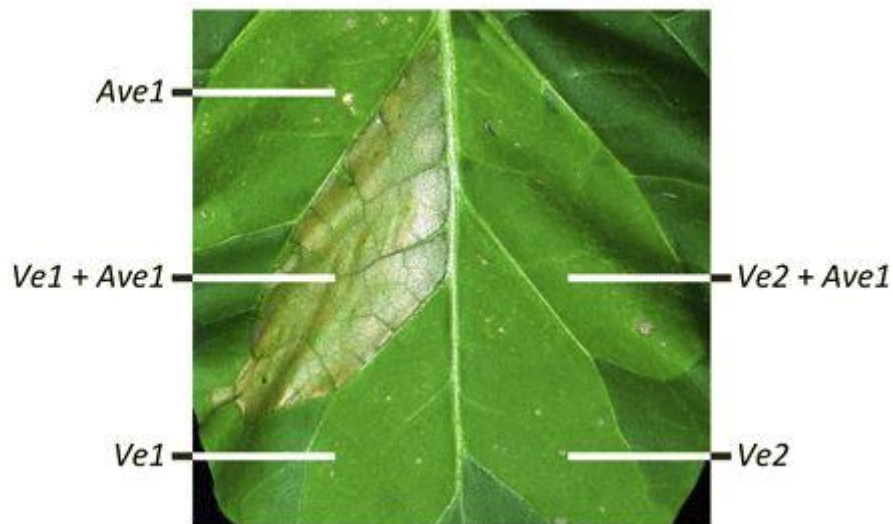


Figure A-22 : Co-expression transitoire d'*Ave1* et des gènes *Ve* chez *Nicotiana tabacum* (extrait de de Jonge *et al.*, 2012).

La co-expression de *Ve1* et d'*Ave1* provoque une réaction d'hypersensibilité alors qu'aucune réaction n'est visible lors de la co-expression de *Ve2* et d'*Ave1*. Les expressions séparées de *Ve1* et *Ve2* servent de témoins négatifs.

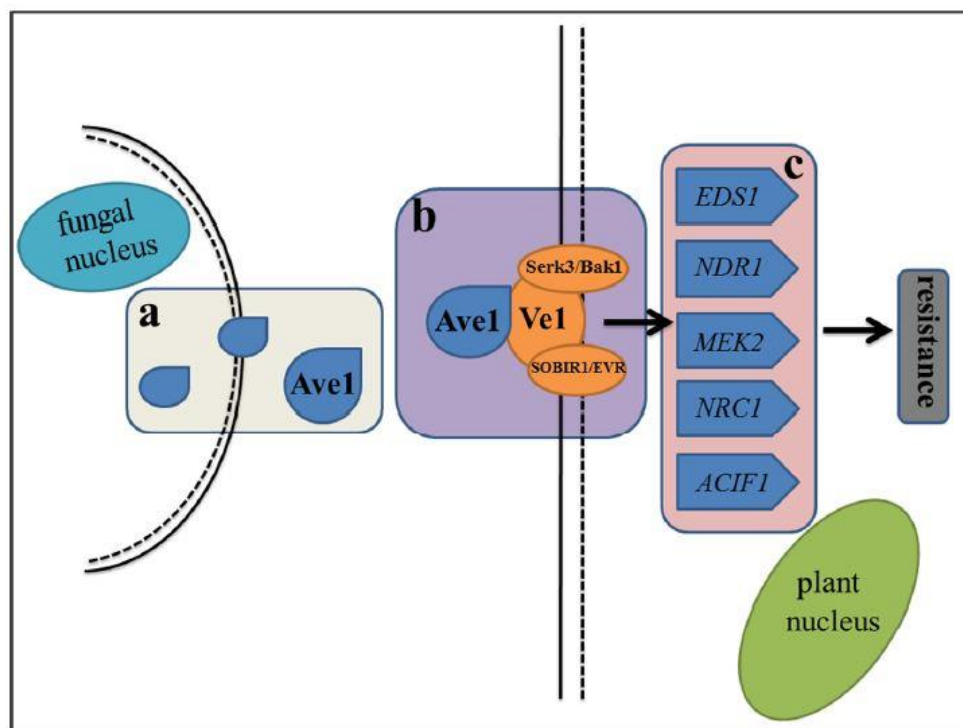


Figure A-23 : Exemple d'un modèle de la voie de signalisation induite par *Ve1* chez la tomate (extrait de Luo *et al.*, 2014).

a. Sécrétion des effecteurs *Ave1* par *V. dahliae*. b. Les récepteurs de type kinase *Serk3/Bak1* et *SOBIR1/EVR* interagissent avec le récepteur de type protéine *Ve1*. c. *EDS1* est le premier gène identifié nécessaire à la résistance, *NDR1*, *MEK2*, *NRC1* et *ACIF1* sont des gènes de résistance participant à la mise en place de la résistance.

a mis en évidence plus de 8 000 gènes exprimés chez JR2 dont un seul se situait dans cette zone de 50 kb. *AVE1* est un gène d'une longueur de 582 bp, codant une protéine sécrétée de 134 acides aminés. L'analyse fonctionnelle d'*AVE1* réalisée chez *Arabidopsis thaliana* et chez la tomate a ensuite confirmé qu'il activait bien la résistance à *V. dahliae* race 1 et qu'il contribuait à la virulence de ces souches. De plus la combinaison de l'expression de *VE1* et d'*AVE1* provoque une réaction d'hypersensibilité (HR) chez *Nicotiana tabacum*, caractéristique parfois présente dans les résistances qualitatives (**Figure A-22**, de Jonge *et al.*, 2012).

A ce jour, les mécanismes de perception de l'agent pathogène et les voies de signalisation activant la résistance *VE1* dépendante ne sont pas tous caractérisés. Néanmoins, l'implication des gènes *EDS1* (enhanced disease susceptibility 1), *MEK2* (MAP kinase 2), *NDR1* (non-race specific disease resistance 1) *NRC1* (récepteur NB-LRR requis pour la réaction LR), *AC1F1* (protéine F-box) dans cette voie de signalisation a été démontrée par VIGS chez la tomate (Fradin *et al.*, 2009). Deux autres études ont pu mettre en évidence la nécessité des récepteurs de type kinase (RLKs) *SOBIR1/EVR* et *SERK3/BAK1* dans cette voie (**Figure A-23**, Liebrand *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013).

b. Résistance quantitative

Différentes sources de résistance quantitative à *Verticillium* ont été identifiées chez des plantes cultivées ou des plantes modèles ; certaines sont des homologues à *VE* alors que d'autres sont de nature différente.

Résistances quantitatives conférées par des gènes homologues à *VE*

Des homologues au gène *VE* ont été découverts dans différentes espèces mais le rôle de ces gènes dans la résistance à *Verticillium* n'a pas été validé chez la laitue (*Lactuca sativa*) ou la pomme de terre (*Solanum tuberosum*).

Chez le coton (*Gossypium barbense*, *Gossypium hirsutum*) des homologues de *VE*, *GbVE* (issu du cultivar Pima90-53), *GbVE1*, *GbAVD1*, *GbAVD2*, *GbVDR3*, *GbVDR5*, *GbVDR6* (tous issus du cultivar Hai 7124) et *GhVE1* (issu du cultivar Maxxa) ont été identifiés (**Figure A-21**). Les souches de *Verticillium dahliae* pathogènes du coton sont classées en fonction des phénotypes de maladies observés chez leur hôte : certaines souches sont dites défoliantes (flétrissement important et chute des feuilles) alors que les autres sont appelées non défoliantes (flétrissement modéré et peu de chute de feuilles). La surexpression de *GbVE* chez *Arabidopsis thaliana* (fond génétique Columbia) confère une meilleure résistance des plantes à *Verticillium dahliae* T5 (souche très agressive et défoliante chez le coton) (Zhang *et al.*, 2011). Les gènes *GbVE1*, *GbVDR3*, *GbVDR5*, *GbAVD1* et *GbAVD2* sont nécessaires à la

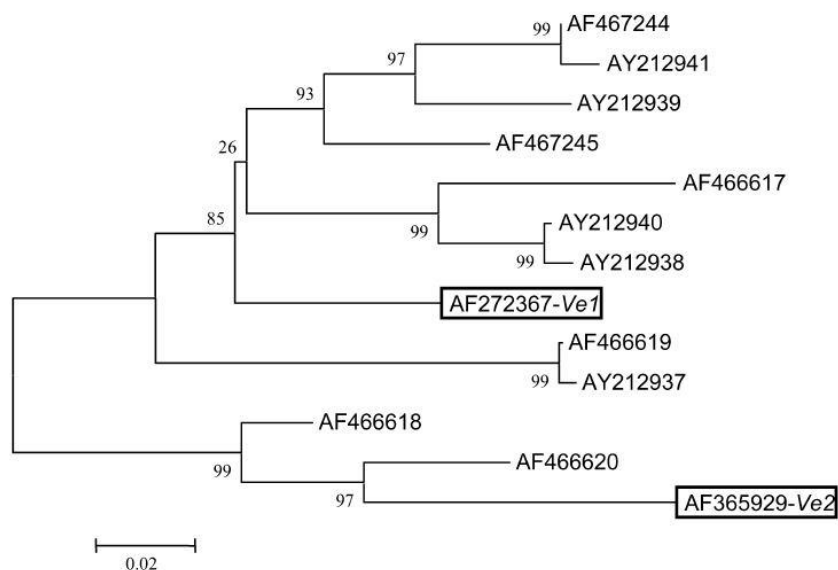


Figure A-24 : Dendrogramme obtenu à partir des séquences protéiques prédites des homologues à VE chez *Solanum tuberosum* cv. Reddale (extrait de Simko *et al.*, 2004).
VE1 et VE2 sont encadrés.

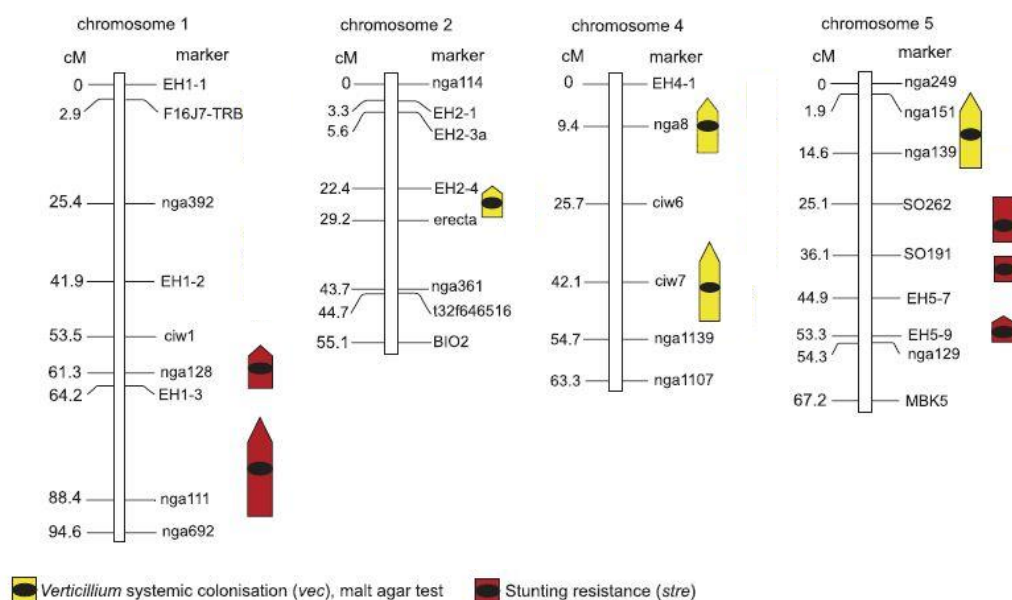


Figure A-25 : Localisation de QTLs contrôlant la résistance à *Verticillium longisporum* chez *Arabidopsis thaliana* (extrait de Häffner *et al.*, 2010).

résistance aux souches V991 (défoliante) et BP2 (non-défoliante) de *Verticillium dahliae* car leur extinction par VIGS (virus-induced gene silencing) provoque la sensibilité du cultivar naturellement résistant Hai 7124. La surexpression des gènes *GbVE1*, *GbVDR3*, *GbVDR5*, *GbVDR6*, *GbAVD1* et *GbAVD2* confère une résistance partielle à ces deux souches chez *Arabidopsis thaliana* (fond génétique Columbia) (Zhang *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2015, 2018; Chen *et al.*, 2016, 2017).

Chez la laitue (*Lactuca sativa*), une détection de QTL chez la population recombinante issue du croisement entre Salinas 88 (sensible à *V. dahliae* race 1 souche VdLs16) et La Brillante (résistante) a mis en évidence l'existence du gène de résistance dominant à effet majeur *VR1*, homologue de *VE2* (Hayes *et al.*, 2011).

Chez la pomme de terre diploïde *Solanum tuberosum*, l'homologue *StVE1* à *VE1* a été identifié sur le chromosome 9 du parent résistant BD142-1 (**Figure A-21**). Il est en déséquilibre de liaison avec le marqueur microsatellite STM1051 (distance génétique de 1,5 cM). Ce microsatellite a été ensuite utilisé comme gène marqueur candidat à la résistance à *Verticillium dahliae* race 1 et l'association entre ce marqueur et le niveau de résistance à la verticilliose chez 139 cultivars tétraploïdes de pomme de terre a été testé. Cette association a été confirmée, puis les homologues de *VE* ont été clonés à partir du cultivar résistant Reddale. Au moins onze homologues ont été détectés. Les protéines possèdent entre 74 et 99,6% d'homologie avec *VE1* et *VE2* (**Figure A-24**, Simko *et al.*, 2004).

Résistances quantitatives conférées par des gènes non homologues à *VE*

Chez *Arabidopsis thaliana*, des QTLs de résistance à *Verticillium longisporum* souche 43 ont été détectés dans une population de RILs issue du croisement entre les écotypes Burren (résistant) et Landsberg *erecta* (sensible). Parmi les différents traits étudiés, 5 QTLs sont associés à la résistance au flétrissement (chromosome 1 et 5) et quatre QTLs sont associées à la résistance à la colonisation par *Verticillium longisporum* (chromosome 2, 4 et 5). Cette étude a permis de mettre en évidence l'existence de mécanismes génétiques différents contrôlant le flétrissement et la colonisation des parties aériennes puisque ces QTLs ne colocalisent pas (**Figure A-25**, Häffner *et al.*, 2010).

Deux QTLs majeurs communs à plusieurs environnements pour la résistance à *Verticillium longisporum* ont également été découverts sur les groupes de liaison N14 et N15 du colza *Brassica napus* à partir d'une population de 163 individus double haploïdes dérivés de la culture de microspore d'individus F1 issus du croisement entre 307-406-1 (parent sensible) et 307-230-2 (parent résistant). L'obtention des phénotypes de maladie a été réalisée à partir d'individus inoculés par différents mélanges de quatre souches de *Verticillium longisporum* (soit quatre environnements), en utilisant une échelle d'évolution des symptômes basées sur le pourcentage de feuilles présentant des symptômes de flétrissement et des chloroses entre 8 et 10 semaines après inoculation (Rygulla *et al.*, 2008).

Chez le houblon (*Humulus lupulus*), *Verticillium albo-atrum* est l'espèce causant le plus de dégâts. L'évaluation de la réponse à l'isolat isolé par Radisek en 2006 de *Verticillium albo-atrum* d'une population F2 dérivée à partir du parent résistant Wye Target et du parent sensible BL2/1 a permis d'identifier un QTL de résistance au niveau du groupe de liaison 7 (Jakse *et al.*, 2013).

Chez le coton, de nombreux gènes impliqués dans la résistance quantitative à *Verticillium dahliae* et non homologues aux gènes VE ont également été décrits. Par exemple, l'étude du secrétome apoplastique du cultivar Hai 7124 après infection par *Verticillium dahliae* suivie d'une validation fonctionnelle par VIGS a permis de mettre en évidence le rôle de *GbNRX1* (nucleoredoxine) dans la résistance à *Verticillium dahliae*. Ce gène est impliqué dans le métabolisme des radicaux libres (ROS) (Li *et al.*, 2016). Le gène *GbSBT1* encodant une subtilase reconnaît la protéine effectrice PHB de *Verticillium dahliae* est impliqué dans l'induction de la résistance du cultivar Pima-90 (Duan *et al.*, 2016). L'extinction de l'expression des gènes *Gh-LYK1* et *Gh-LYK2* (encodant des récepteurs kinases à motifs lysines (LYKs)), *GbANA1* (encodant une protéine à domaine NB-ARC), *GbLYP1*, *GbLYPK7*, *GbLYSME3* (encodant des protéines contenant des motifs lysines) par VIGS provoque respectivement une diminution de la résistance de *Gossypium hirsutum* et *Gossypium barbadense* (Li *et al.*, accepted; Gu *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2017). Les facteurs de réponse à l'éthylène *GbERF1* (impliqué dans la régulation positive de la synthèse de la lignine) et *GbERFb* surexprimés respectivement chez *Arabidopsis thaliana* et *Nicotiana tabacum* confère une meilleure résistance à *Verticillium dahliae* alors que leur sous-expression rend le cultivar Hai 7124 plus sensible au pathogène (Guo *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2017). Le gène *GhSKIP35* (encodant une protéine partenaire de SKP1, ligase impliquée dans l'ubiquitination) exprimé chez *Arabidopsis thaliana* provoque une plus grande tolérance à *Verticillium dahliae* (Zhang *et al.*, 2017). La surexpression de *GhPFN2* (gène encodant une profine) chez *Gossypium hirsutum* a pour conséquence une meilleure résistance à *Verticillium dahliae* grâce à des modifications de l'organisation du cytosquelette des cellules racinaires (Wang *et al.*, 2017). Une analyse du profil transcriptomique de *Gossypium hirsutum* cultivar Zhongzhimian KV3 inoculé par *Verticillium dahliae* souche V991 a permis de mettre en évidence 106 gènes candidats impliqués dans la QDR à *Verticillium dahliae*. Parmi ces gènes, l'extinction de l'expression par VIGS de *GhWRKY22*, *GhWRKY33*, *GhChitinase*, *GhCML* (calmodulin binding protein), et *GhDirigent* (encodant une protéine impliquée dans la lignification du coton) provoque une plus grande sensibilité du coton à *Verticillium dahliae* (Zhang *et al.*, 2016). Le gène encodant une protéine ribosomale L18 du coton sauvage *Gossypium arboreum* (GaRPL18) exprimé chez *Arabidopsis thaliana* rend l'arabette plus résistante à *Verticillium dahliae* alors que sa sous-expression rend le coton plus sensible à la verticilliose (Gong *et al.*, 2017). Une étude de génétique d'association conduite sur 299 variétés différentes de *Gossypium hirsutum* a permis d'identifier le gène *CG02* (candidat gene 02, il encode une protéine TIR-NBS-LRR) comme gène

candidat à la résistance à *Verticillium dahliae*. La sous-expression de ce gène par VIGS provoque une plus grande sensibilité à la verticilliose et ce gène est également sur-exprimé chez des cultivars résistants tels que Zhongzhimian 2 (Li *et al.*, 2017). Une recherche de QTLs a également été réalisée chez une population dérivée du croisement interspécifique entre la lignée très résistante Hai 1 (*Gossypium barbense*) et la variété sensible CCRI36 (*Gossypium hirsutum*). Cette étude a permis l'identification de 48 QTLs de résistance à *Verticillium dahliae* dont 42 nouveaux QTLs (31 provenant de *Gossypium barbense*, et 11 provenant de *Gossypium hirsutum*) (Shi *et al.*, 2016).

Des études ont également été menées chez la luzerne tétraploïde (*Medicago sativa*). Les premiers résultats ont été obtenus à partir de treize populations artificielles provenant de trois entreprises semencières (Alforex Seeds, Forage Genetics et Pioneer Hi-bred). Dix-sept marqueurs SNPs liés à la résistance à *Verticillium alfalfae* ont été identifiés et localisés sur les chromosomes 1, 2, 4, 7 et 8 (Zhang *et al.*, 2014). Une autre étude réalisée à partir de 179 lignées élités de luzerne issues de trois programmes de sélection différents fournis par la société semencière Forage Genetics International a mis en évidence de nouveaux QTLs sur les chromosomes 5, 6, 7 et 8 (Yu *et al.*, 2016, 2017b).

Les études conduites sur les mécanismes de résistance à *Verticillium* sp. chez *Medicago truncatula* sont présentées à partir de la page 101. A ce jour, aucun gène de résistance quantitative à *Verticillium alfalfae* n'a été cloné.

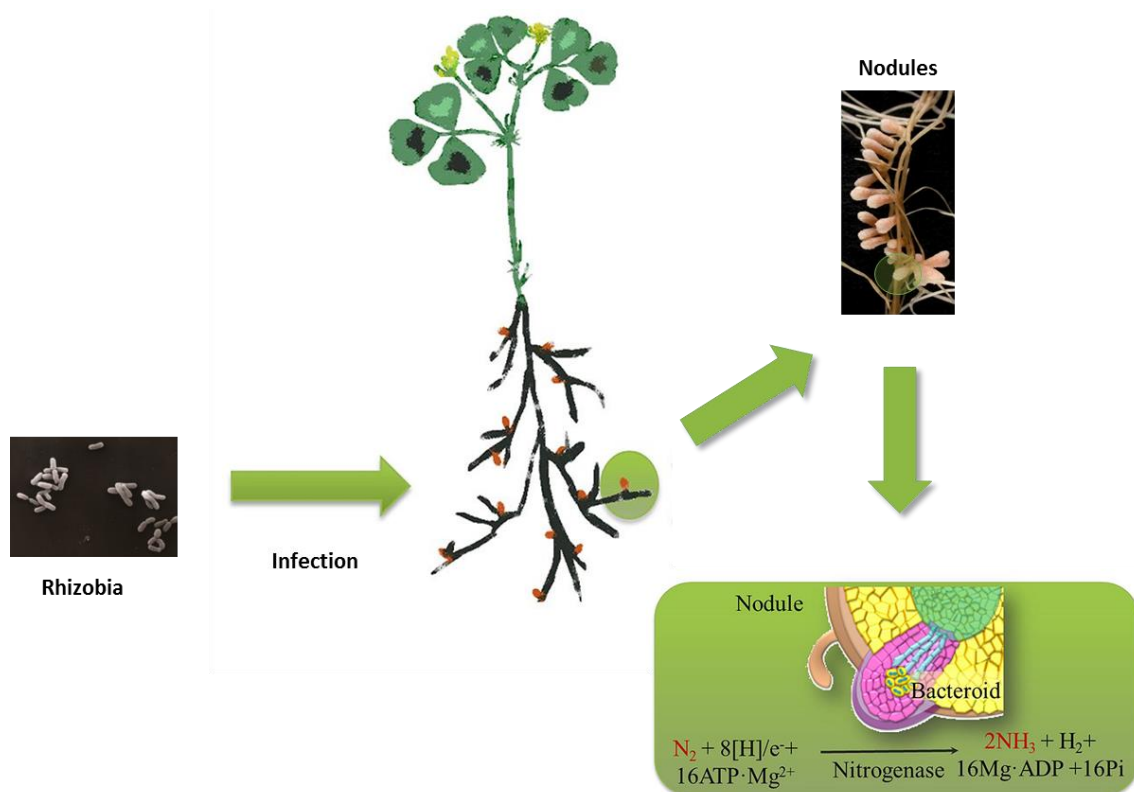


Figure A-26 : Schéma global de la symbiose chez les légumineuses (adapté de Maroti and Kondorosi, 2014; Teng *et al.*, 2015).

Les bactéries rhizobia infectent les racines des légumineuses, puis les nodules sont formés, siège de la réaction biologique de la fixation d'azote.

IV. *Medicago truncatula*, plante modèle des légumineuses

1. Importance nutritionnelle et écologique des légumineuses

La famille des légumineuses (Fabacées) est la seconde famille de plantes la plus importante pour sa valeur économique et nutritionnelle après les graminées (Poacées). Il existe environ 17 000 espèces de légumineuses dans la nature dont beaucoup jouent un rôle essentiel dans la nutrition humaine et le fonctionnement des écosystèmes. Le principal atout écologique et agronomique des légumineuses réside en leur capacité à fixer le diazote atmosphérique sous forme d'azote minéral assimilable par la plante grâce à l'établissement d'une symbiose avec des bactéries fixatrices d'azote, les rhizobia (*Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* et *Sinorhizobium*, **Figure A-26** (Maroti and Kondorosi, 2014; Teng *et al.*, 2015)). Grâce à cette capacité, les cultures de légumineuses ne nécessitent pas d'engrais azoté, et l'implantation d'un blé ou d'un colza après un pois permet de réduire les apports d'azote respectivement de 23% et 17% (Carrouée *et al.*, 2012). Les légumineuses à graines et fourragères sont cultivées sur plus de 200 millions d'hectares, soit 15% de la surface terrestre. Environ 33% des besoins journaliers humains en azote sont couverts par des légumineuses (parfois jusqu'à 60% dans les pays en développement), et 40% des huiles de cuisine proviennent du soja et de l'arachide (O'Rourke *et al.*, 2014).

Les autres services écosystémiques rendus par l'implantation des légumineuses sont une amélioration de la structure des sols, et une diversification des rotations permettant d'interrompre ainsi les cycles de développement des agents pathogènes telluriques (Voisin *et al.*, 2014).

Depuis le début des années 1990, l'agriculture intensive basée sur un apport important en intrants (engrais, pesticides) qui a permis à l'Europe d'atteindre l'autosuffisance alimentaire après la seconde guerre mondiale, a été remise en cause de par ses impacts négatifs sur l'environnement (pollution environnementale, eutrophisation, émissions de gaz à effet de serre, perte de biodiversité, ...). Cette prise de conscience environnementale et l'existence d'aides financières européennes conditionnées à la présence de légumineuses dans les rotations des cultures, à la biodiversité des productions, au maintien de surfaces en prairie permanente et à la présence de surfaces d'intérêt écologiques (arbres, haies, mares, CIPAN - Culture intermédiaire piège à nitrates -, bandes enherbées, ...) contribuent à la modification des pratiques agricoles afin d'obtenir une agriculture plus durable tout en maintenant des rendements suffisants (Politique Agricole Commune 2015-2020). L'agriculture française connaît aujourd'hui un regain d'intérêt pour les cultures de légumineuses et des initiatives de mise en place de cultures associées telles que les associations blé/lentille voient le jour malgré la présence de contraintes techniques et mécaniques (Voisin *et al.*, 2014; Lemken *et al.*, 2017).

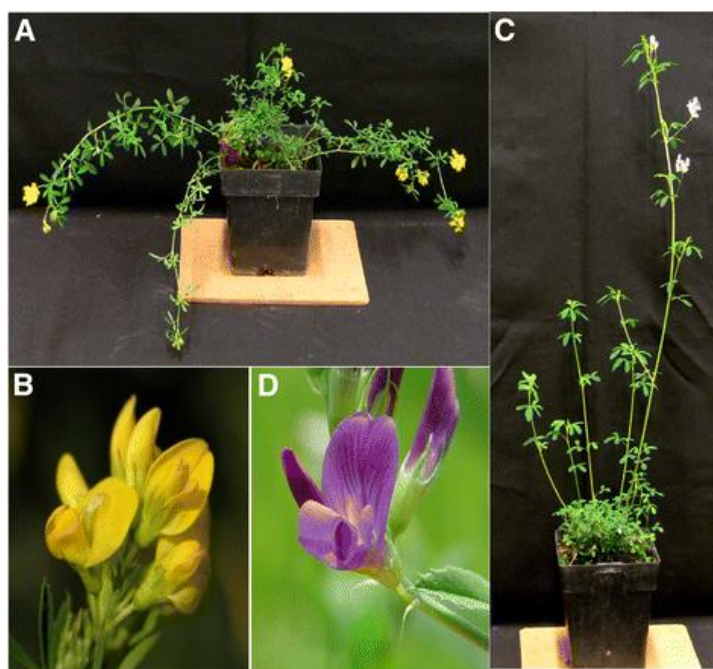


Figure A-27 : Caractéristiques morphologiques des fleurs et ports de *Medicago sativa* subsp. *falcata* et *Medicago sativa* subsp. *sativa* (extrait de O'Rourke *et al.*, 2015).

A et B. Port retombant et fleurs jaunes de *Medicago sativa* subsp. *falcata*.

C et D. Port dressé et fleurs violettes de *Medicago sativa* subsp. *sativa*.

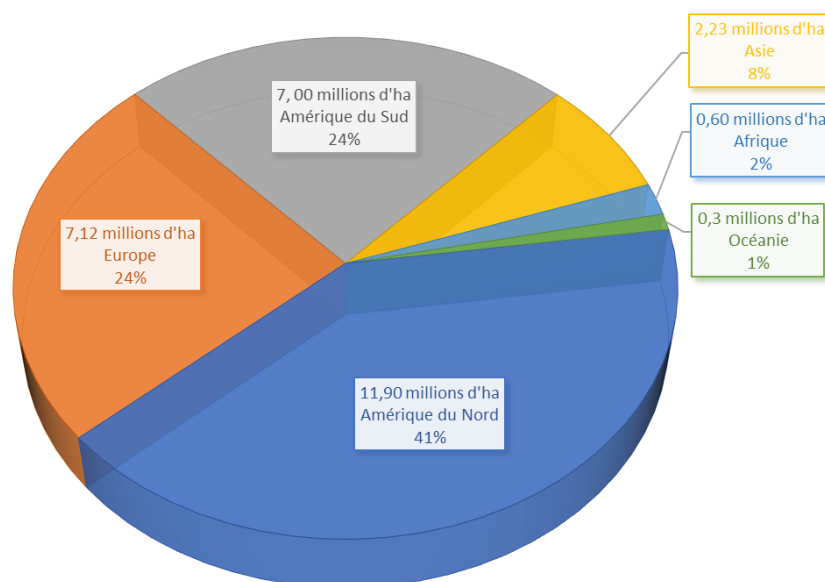


Figure A-28 : Surfaces mondiales de luzerne cultivée par continent en 2009 (extrait de Yuego and Cash, 2009).

Les pourcentages expriment la part des surfaces de luzerne cultivée par continent par rapport aux surfaces mondiales.

2. *Medicago sativa* et *Medicago truncatula*, plantes hôtes de *Verticillium* sp.

a. *Medicago sativa*, une culture fourragère mondiale majeure

L'appellation « luzerne cultivée » regroupe communément les sous-espèces issues des deux sous-espèces primaires : *Medicago sativa* subsp. *sativa* (la plus cultivée, allogame diploïde ou tétraploïde, fleurs bleues, port dressé et gousses spiralées) et *Medicago sativa* subsp. *falcata* (allogame diploïde ou tétraploïde, fleurs jaunes, port retombant et gousses falciformes, **Figure A-27**). Les premières traces de cultures de *Medicago sativa* subsp. *sativa* auraient été identifiées dix mille ans avant Jésus-Christ en Syrie et six mille ans avant Jésus-Christ au Sud-Ouest de l'Iran. Quant à *Medicago sativa* subsp. *falcata*, sa présence a été confirmée entre quatre mille et deux mille ans avant Jésus-Christ au Nord-Ouest du Pakistan, au nord de l'Afghanistan et dans le Cachemire (Russelle, 2001; Li and Brummer, 2012). A partir de ces centres d'origine, la diffusion de la luzerne à travers le Moyen-Orient, l'Afrique, l'Asie et l'Europe a eu lieu par le commerce mais aussi par les différentes conquêtes des armées grecques et romaines autour du bassin Méditerranéen. En effet, la luzerne était utilisée comme fourrage pour les chevaux de ces armées. La luzerne a ensuite été importée en Amérique du Sud au XV^{ème} siècle par les espagnols et aux Etats-Unis, en Australie et au Canada par les Britanniques et les Français aux XVIII^{ème} et XIX^{ème} siècles lors des différentes vagues de colonisation (Prosperi *et al.*, 2014). La luzerne est également le plus ancien fourrage pour lequel nous possédons un nom, même si son origine étymologique reste incertaine. En effet, alfalfa (luzerne en anglais) dériverait du perse « aspo-asti » (fourrage pour cheval), de l'arabe « al-fasfasa » ou du cachemiri « ashwa-bal » (puissance du cheval). Quant au nom « luzerne », il serait inspiré du perse « läjwärd » (lapis-lazuli), roche métamorphique principalement constituée de lazurite, minéral bleu marine rapellant la couleur des fleurs de *Medicago sativa* subsp. *sativa* (Russelle, 2001).

Les légumineuses fourragères pluriannuelles telles que la luzerne ont toujours été plus cultivées que les légumineuses fourragères annuelles comme *Medicago truncatula* et sont utilisées pour nourrir le bétail. De plus, dès la renaissance, leur capacité symbiotique était reconnue : elles étaient utilisées afin d'augmenter la quantité d'azote disponible dans le sol pour la culture céréalière suivante (Annicchiarico *et al.*, 2015). De nos jours, la luzerne est cultivée principalement dans les régions tempérées telles que l'Afrique du Sud, l'Argentine, l'Australie, le Canada, le Chili, la Chine, les Etats-Unis, la France, l'Italie, la Nouvelle-Zélande et le Sud de la Russie sur une surface totale moyenne de 30 millions d'hectares depuis les années 1990 pour un rendement de 436 millions de tonnes en 2006 (Ilao *et al.*, 2014). Les pays les plus producteurs sont les Etats-Unis (9 millions d'hectares), l'Argentine (6,9 millions d'hectares), le Canada (2 millions d'hectares), la Russie (1,8 millions d'hectares) et l'Italie et la Chine (1,3 millions d'hectares). A titre d'exemple, cette production agricole rapporte chaque année plus de 10 milliards de dollars aux Etats-Unis (O'Rourke *et al.*, 2015).

Tableau A-8 : Pathogènes de *Medicago sativa* et pathogènes étudiés chez *Medicago truncatula*.

Les principaux pathogènes de la luzerne et les études réalisées sur *Medicago sativa* sont en gras.

Type de pathogène	Pathogène	Maladie causée	Références
Pathogènes foliaires	<i>Cercospora medicaginis</i>	Cercosporiose	Djébali <i>et al.</i> , 2010
	<i>Colletotrichum trifolii</i>	Anthraxnose	Ameline-Torregrosa <i>et al.</i> , 2008
	<i>Didymella pinodes</i>	Ascochytose	Madrid <i>et al.</i> , 2014
	<i>Erysiphe pisi</i> , <i>Erysiphe trifolii</i>	Oïdium	Ameline-Torregrosa <i>et al.</i> , 2008; Fondevilla <i>et al.</i> , 2013
	<i>Leptosphaerulina trifolii</i>	Tige noire	Barbetti, 2007
	<i>Peronospora trifoliorum</i>	Mildiou	Yaeger and Stuteville, 2000
	<i>Phoma medicaginis</i>	Tige noire	Ellwood <i>et al.</i> , 2006b; Djébali <i>et al.</i> , 2007; Jasiński <i>et al.</i> , 2009
	<i>Pseudopeziza medicaginis</i>	Pseudopeziza ou maladie des tâches communes	Wang <i>et al.</i> , 2012
	<i>Sclerotinia trifoliorum</i>	Sclérotiniose	Liatukienė <i>et al.</i> , 2012
	<i>Uromyces striatus</i>	Rouille	Rubiales <i>et al.</i> , 2011
Pathogènes racinaires	<i>Aphanomyces euteiches</i>	Pourriture racinaire	Pilet-Nayel <i>et al.</i> , 2009; Djébali <i>et al.</i> , 2009; Bonhomme <i>et al.</i> , 2013; Badis <i>et al.</i> , 2015; Rey <i>et al.</i> , 2016
	<i>Fusarium oxysporum</i>	Fusariose	Ramírez-Suero <i>et al.</i> , 2010; Thatcher <i>et al.</i> , 2016
	<i>Phytophthora medicaginis</i>	Pourriture racinaire	Anderson <i>et al.</i> , 2010; Samac <i>et al.</i> , 2011
	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Flétrissement bactérien	Vailleau <i>et al.</i> , 2007; Ben <i>et al.</i> , 2013b; Yamchi <i>et al.</i> , 2018
	<i>Rhizoctonia solani</i>	Rhizoctone violet, Pourriture racinaire	Anderson <i>et al.</i> , 2013
	<i>Verticillium</i> sp.	Verticilliose	Ben <i>et al.</i> , 2013a; Negahi <i>et al.</i> , 2013, 2014; Zhang <i>et al.</i> , 2014; Yu <i>et al.</i> , 2016, 2017b; Toueni <i>et al.</i> , 2016

De plus, devant le développement croissant de l'élevage industriel et surtout de l'élevage de bovins laitiers en Asie, la demande mondiale en luzerne augmente : la Chine importait 2,321 millions de tonnes de foin de luzerne des Etats-Unis en 2007 et initie depuis son propre programme de développement de culture de luzerne dans la province du Ningxia (Yuego and Cash, 2009).

Afin de répondre à cette demande mondiale, le maintien voire l'augmentation des rendements en luzerne de qualité est une nécessité. Pour cela, les principaux traits pris en compte dans les programmes de sélection variétale de la luzerne sont le rendement en fourrage, la qualité nutritionnelle (et notamment la teneur en fibres pour une bonne digestibilité) et la tolérance au pâturage, au froid, aux maladies et aux ravageurs (Boelt *et al.*, 2015). Les principaux pathogènes de la luzerne ainsi que les pathogènes étudiés chez *Medicago truncatula* sont présentés dans le **Tableau A-8**. D'après Coop de France déshydratation (coopérative spécialisée dans la déshydratation de la luzerne, <http://www.culture-luzerne.org>), les maladies causant le plus de dommages aux cultures de luzerne en France sont la verticilliose (flétrissement et mort des plantes, destruction des racines et propagation par coupe, **Figure A-29-D**), le rhizoctone violet (les pivots racinaires et les collets sont entourés par un manchon violet, l'écorce est envahie par le champignon et se détache, les plantes se dessèchent et meurent, **Figure A-29-C**), l'antracnose (la base des tiges des plantes atteintes présente des lésions beiges bordées de brun avec un centre plutôt gris clair et ponctué de brun foncé, la tige reste verte alors que les feuilles se flétrissent et deviennent jaunes) et la maladie de la tige noire causée par *Phoma medicaginis* (des lésions brun foncé à noires pouvant évoluer en chancre se développent sur les tiges, et sur les feuilles, des petites taches plus ou moins brunes et de forme irrégulière apparaissent, puis le feuillage peut dépérir, **Figure A-29-A**). Les autres maladies présentées dans le **Tableau A-8** n'ont que peu d'incidence sur la culture de luzerne en France.

En ce qui concerne les ravageurs de la luzerne, le nématode *Ditylenchus dipsaci* est le plus commun en Europe, les larves et les adultes creusent des cavités à la surface des tiges et des feuilles, ce qui a pour conséquences une déformation des feuilles, un épaississement foliaire, un tallage excessif et une plante courte et rabougrie. La sitone du pois (*Sinotana lineatus*, **Figure A-29-E** et **F**) et l'apion (*Apion pisi*, **Figure A-29-G**) sont les insectes causant le plus de dégâts sur la luzerne : la sitone se nourrit du parenchyme des feuilles en pratiquant des encoches semi-circulaires sur leur pourtour, pouvant ainsi limiter la densité des jeunes semis. Quant à leurs larves, elles se nourrissent des nodules et des racines et créent des retards de végétation. La larve de l'apion dévore l'intérieur des bourgeons terminaux, provoquant ainsi un retard au démarrage de la végétation (Encyclopédie des ravageurs européens, HYPPZ, <https://www7.inra.fr/hyppz>).

Les cuscutes (*Cuscuta* sp.) sont des parasites végétaux qui s'attaquent notamment aux légumineuses. Elles se présentent sous forme de filaments (**Figure A-29-H**) : les jeunes plantes germent à proximité

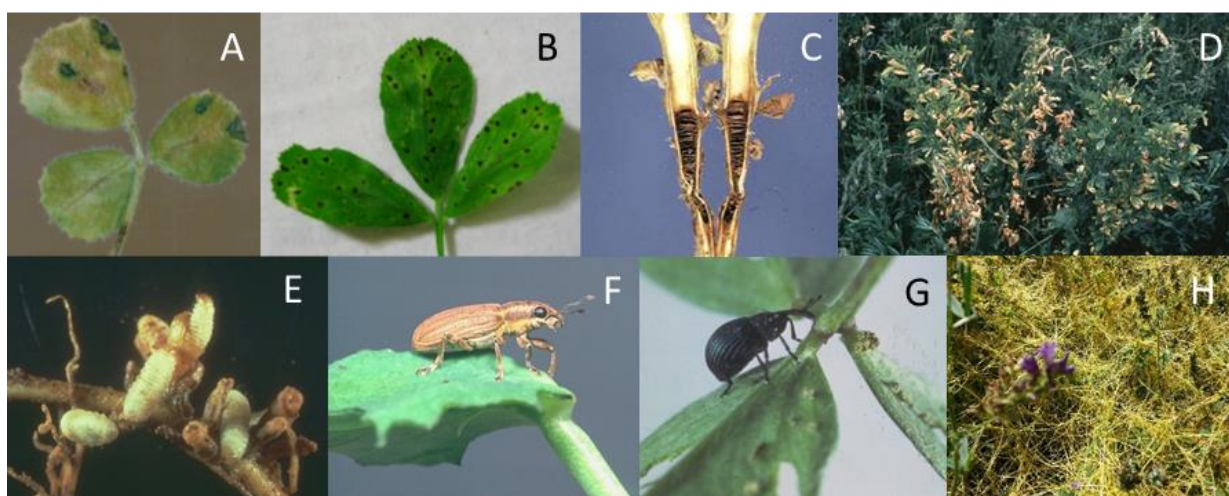


Figure A-29 : Exemples de symptômes de maladies, de ravageurs et de parasites de la luzerne.

A. *Phoma medicaginis* sur feuille de *Medicago truncatula* (Tivoli *et al.*, 2006).

B. *Pseudopeziza medicaginis* sur feuille de *Medicago sativa* (Kechang *et al.*, 2009)

C. *Rhizoctonia solani* sur racine de *Vicia faba* (<https://cropgenebank.sgrp.cgiar.org/>)

D. *Verticillium alfalfae* sur *Medicago sativa* (<https://pnwhandbooks.org/plantdisease>)

E et F. Larves et adultes de *Sinotana lineatus* sur pois (HYPPZ, <https://www7.inra.fr/hyppz>)

G. *Apion pisi* sur feuilles de *Medicago sativa* (HYPPZ, <https://www7.inra.fr/hyppz>)

H. *Cuscuta* sp. sur luzerne (<http://www.gnis.fr/>)

des plantes hôtes, puis s'attachent aux parties aériennes des plantes en émettant des suçoirs dans les vaisseaux conducteurs de sève pour s'alimenter. Elles se développent rapidement par multiplication végétative et produisent un grand nombre de graines (de 200 à 3000 par tige). En production fourragère, elles provoquent des pertes de rendements et sont également très problématiques pour la production de semence : après récolte, les semences de luzerne ne doivent pas contenir de graines de cuscutes afin de pouvoir être commercialisées (Rubiales and Fernández-Aparicio, 2012).

Compte-tenu de l'importance économique de la luzerne et de l'impact de la verticilliose sur cette dernière, le développement de variétés très résistantes à cette maladie est nécessaire. Il existe déjà des variétés résistantes à la verticilliose telle que Vertus (Molinéro-Demilly *et al.*, 2006). Cependant, l'identification de gènes de résistance à *Verticillium alfalfae* afin de développer des marqueurs moléculaires pour la sélection assistée par marqueur pourrait faciliter la sélection variétale de la luzerne. Pour étudier ces mécanismes de résistance, la plante modèle *Medicago truncatula* a été choisie notamment pour son petit génome diploïde et son autogamie, contrairement au génome tétraploïde de la majorité des luzernes cultivées et à leur allogamie.



Figure A-30 : Caractéristiques morphologiques des feuilles, fleurs, gousses et graines de *Medicago truncatula*.

(Source : <https://legumeinfo.org/organism/Medicago/truncatula>)

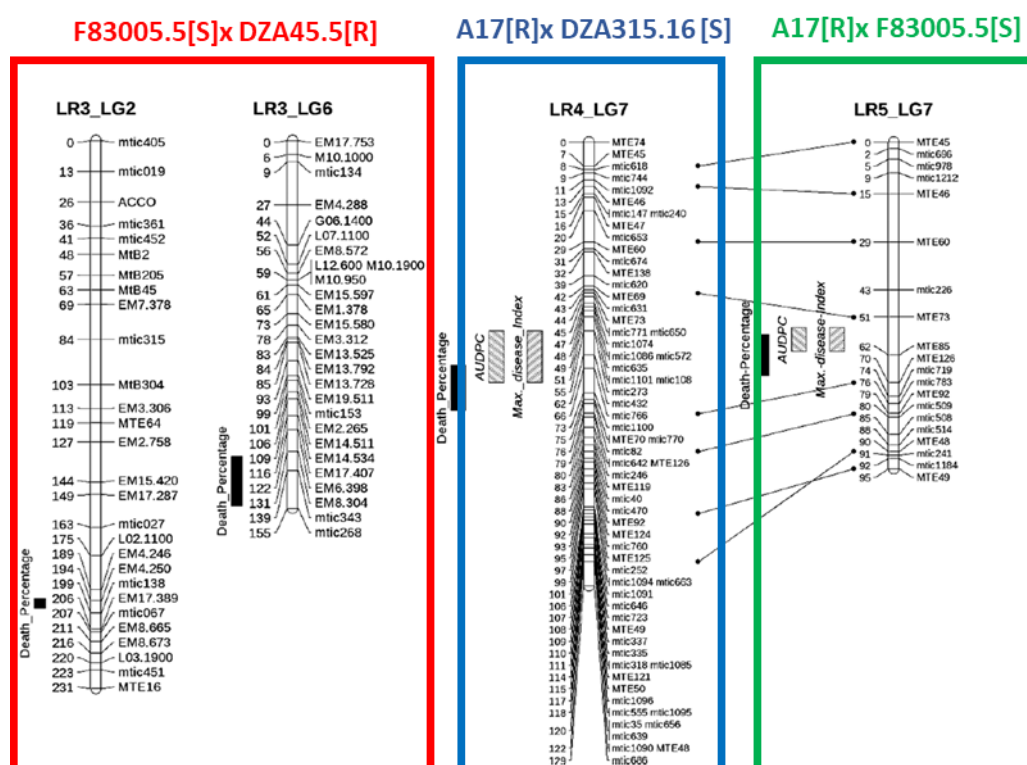


Figure A-31 : Localisation de QTLs contrôlant la résistance à *Verticillium alfalfae* V31-2 chez *Medicago truncatula* (adapté de Ben *et al.*, 2013a).

b. *Medicago truncatula* et *Verticillium alfalfae*, un pathosystème modèle

Medicago truncatula (ou luzerne tronquée, **Figure A-30**) est une des plantes modèles des légumineuses. Peu cultivée (l'Australie est un des rares pays à l'incorporer en tant que prairie temporaire dans les assolements (Annicchiarico *et al.*, 2015)), ce sont ses caractéristiques biologiques (cycle biologique court - de 3 à 6 mois -, autogamie, génome diploïde de petite taille (465 Mb), production de graines en grandes quantités, proximité taxonomique avec d'autres légumineuses (telles que *Medicago sativa*, *Phaseolus vulgaris*, *Arachis hypogaea*, *Lotus japonicus*) qui en ont fait un modèle d'étude (Cook, 1999; Hougaard *et al.*, 2008). D'abord adoptée pour l'étude de la symbiose, elle est également utilisée pour étudier les mécanismes génétiques de résistance aux pathogènes notamment racinaires tels que *Verticillium* sp., *Rasltonia solanacearum* ou encore *Aphanomyces euteiches* (**Tableau A-8**).

Au sein du genre *Verticillium*, l'agent pathogène causant le plus de dommages à *Medicago* sp. est *Verticillium alfalfae* : les plantes sensibles présentent des chloroses, flétrissent et meurent. Néanmoins, des souches telles que LPP0323 de *Verticillium non-alfalfae* ou encore JR2 de *Verticillium dahliae* sont aussi pathogènes chez *Medicago truncatula* (Negahi *et al.*, 2013). L'étude de la réponse à l'infection par Va V31-2 au sein de la core collection de 32 lignées ainsi que des populations de RILs LR3 (F83005.5xDZA45.5), LR4 (A17xDZA315.16) et LR5 (A17xF83005.5) dont la réponse au pathogène des lignées parentales est contrastée, a montré un gradient de niveau de résistance parmi les individus. La résistance à *Verticillium* chez *Medicago truncatula* est donc une résistance quantitative (Ben *et al.*, 2013a).

Au sein de notre laboratoire, quatre QTLs de résistance à *Verticillium nonalfalfae* LPP0323 ont été identifiés au niveau des chromosomes 1, 2, 6 et 8 dans la population LR5 (Negahi *et al.*, 2014). La résistance à *Verticillium alfalfae* V31-2 a été étudiée chez trois populations de RILs : LR5, LR4 et LR3. Un QTL majeur a été identifié chez les populations LR4 et LR5 au niveau du chromosome 7 de *Medicago truncatula* pour trois phénotypes d'évolution de symptômes de flétrissement. Pour la population LR3, deux QTLs mineurs ont été identifiés au niveau des chromosomes 2 et 6 pour le pourcentage de plantes mortes (**Figure A-31**, Ben *et al.*, 2013a). Les caractéristiques de ces différents QTLs sont présentées en annexe **Tableau F-1**, page 405. De plus, chez Va V31-2 et Vna LPP0323, le gène *AVE1* est absent : les mécanismes de résistance à *Verticillium* sp. chez *Medicago truncatula* seraient donc différents de ceux décrits chez le pathosystème *Verticillium dahliae* / *Solanum lycopersicum* (Toueni *et al.*, 2016).

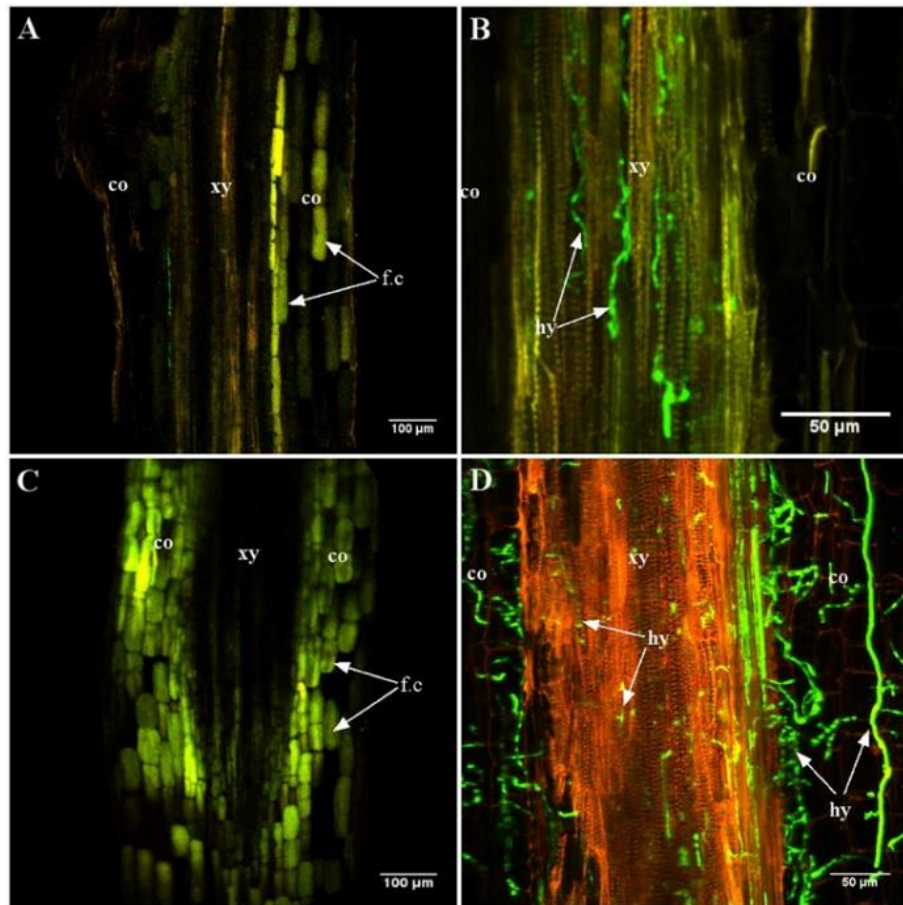


Figure A-32 : Phases tardives de colonisation par *Verticillium alfalfae* V31-2 exprimant une GFP des racines de *Medicago truncatula* des accessions A17 (résistante) et F83005.5 (sensible) (extrait de Toueni *et al.*, 2016).

Observations de coupes longitudinales de racines réalisées par microscopie confocale à balayage laser.

A et C. Accession A17, B et D : accession F83005.5.

A et B. 7 jours après inoculation, le pathogène n'est pas détecté dans les racines de la lignée résistante A17 alors que des hyphes sont observables dans les vaisseaux du xylème de F83005.5.

C et D. 12 jours après inoculation, le pathogène n'est présent que dans la lignée sensible F83005.5, des composés solubles fluorescents apparaissent chez la lignée résistante A17.

co : cortex, hy : hyphe, xy : éléments du xylème, fc : composés fluorescents solubles

Concernant l'infection par *Verticillium alfalfae* V31-2, une analyse histologique réalisée chez la lignée résistante A17 et la lignée sensible F83005.5 inoculées par une souche GFP de V31-2 a montré une germination des spores dans la racine chez la lignée résistante comme la lignée sensible deux heures après inoculation. Des différences de colonisation apparaissent entre 4 et 7 jours après inoculation : les racines de l'accession résistante A17 ne présentent plus aucune trace de *Verticillium alfalfae* V31-2 alors que les hyphes ont complètement colonisé le cylindre central de l'accession sensible F83005.5. Après 12 jours, les hyphes se développent également dans le cortex racinaire chez la lignée sensible F83005.5. La résistance à *Verticillium alfalfae* a donc lieu au niveau de la racine (**Figure A-32**, Toueni *et al.*, 2016). L'analyse transcriptomique avant inoculation par V31-2 (0 heure après inoculation) chez A17 et F83005.5 a montré qu'A17 possède un niveau de résistance basale plus élevé que la lignée sensible. De plus, l'analyse transcriptomique de la réponse précoce à V31-2 (à 4, 8 et 24 heures après inoculation) chez A17 a permis la construction d'un réseau de co-expression de gènes composé de cinq principaux modules contrairement au génotype F83005.5 où la réponse moléculaire à l'inoculation est plutôt désordonnée. Parmi ces modules, les gènes et les facteurs de transcription du module présenté **Figure A-33**, semblent des candidats à la résistance particulièrement prometteurs. En effet ce module regroupe la plupart des gènes différentiellement exprimés en réponse à l'inoculation chez A17 et contient des gènes associés à la perception des PAMPs, aux voies hormonales et des facteurs de transcription. Le rôle dans la réponse de *Medicago truncatula* à la verticilliose de certains des candidats présents dans ce module de co-régulation est aujourd'hui en cours de validation (Toueni *et al.*, 2016).

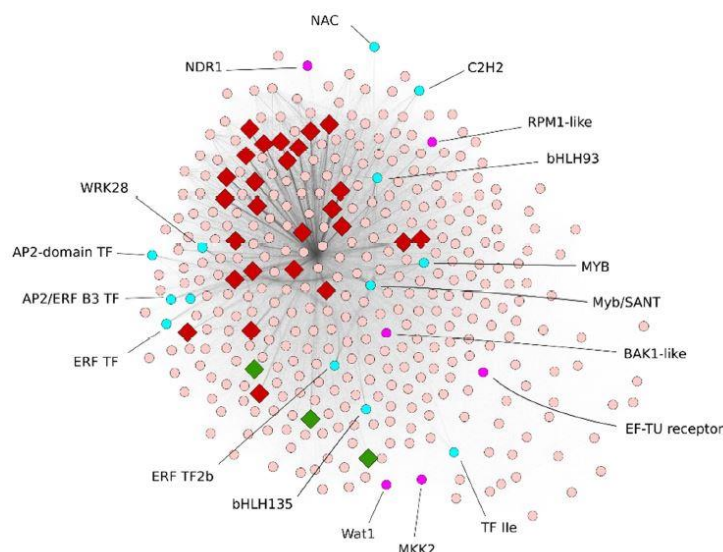


Figure A-33 : Représentation d'un des cinq modules de gènes co-exprimés dans les racines de la lignée résistante A17 lors de la réponse précoce (à 4, 8 et 24 heures après inoculation) à l'inoculation par *Verticillium alfalfae* V31-2 (extrait de Toueni *et al.*, 2016).

Les gènes significativement induits après inoculation sont en rouge, les gènes réprimés en vert. Les facteurs de transcription sont en cyan et les gènes associés à la PTI en violet.

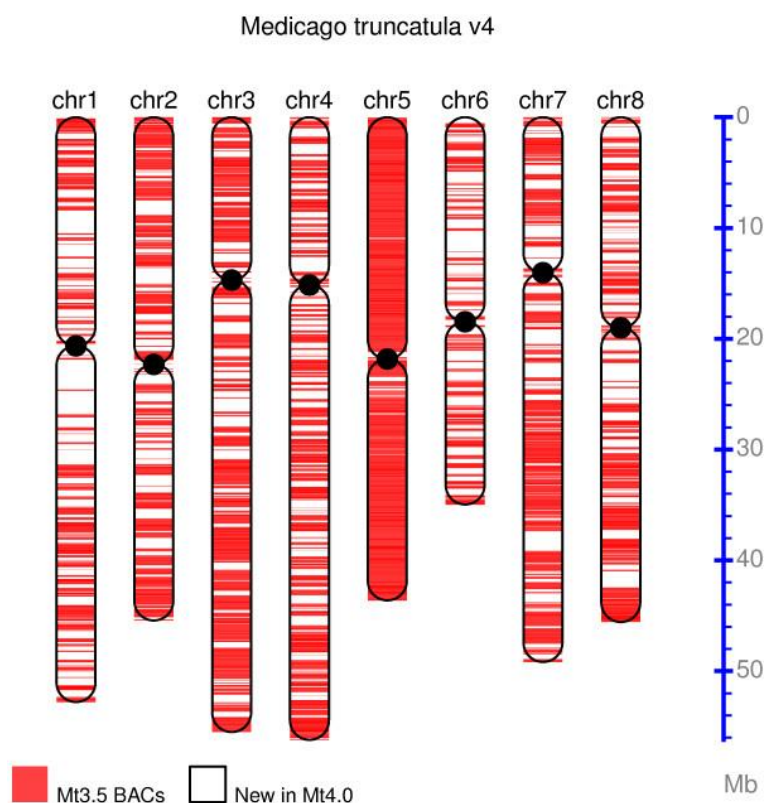


Figure A-34 : Augmentation de l'ancrage des séquences sur le génome Mt4.0 de *Medicago truncatula* par rapport à la version Mt3.5 (extrait de Tang *et al.*, 2014).

Les portions en rouge des chromosomes représentent les séquences ancrées des BACs de la version Mt3.5 (71% des séquences), les régions en blanc correspondent aux nouvelles séquences ancrées dans la version Mt4.0 (93% des séquences).

3. Les ressources génétiques et génomiques disponibles

Les analyses génétiques et génomiques de caractères d'intérêts chez la légumineuse modèle *Medicago truncatula* sont facilitées par la quantité de ressources génétiques et génomiques à disposition de la communauté scientifique.

a. Génome de référence de la lignée A17

Le séquençage du génome complet de *Medicago truncatula* est le fruit d'un consortium international et a débuté en 2003 grâce au financement initial de la National Science Foundation (NSF) américaine et du programme européen Sixth Framework Program (FP6). Les chromosomes 1, 2, 4, 6, 7 et 8 ont été séquencés aux Etats-Unis sur des fonds de la NSF, le chromosome 3 par le Royaume-Uni (fonds européens et du Biotechnology and Biological Sciences Research Council -BBSRC-) et le chromosome 5 par la France (fonds européens et INRA). Quant au choix de la lignée à séquencer, il s'est porté sur la lignée Jemalong A17, cette dernière étant déjà utilisée comme lignée parentale de RILs en 2003 (Young *et al.*, 2003). Ces fonds avaient alors permis le séquençage complet de la portion d'euchromatine du génome de *Medicago truncatula* (soit entre 280 et 300Mb). En effet, les études préliminaires réalisées sur le génome de *Medicago truncatula* montraient que la plupart des gènes de cette plante se trouvaient au sein des régions euchromatiques des bras des chromosomes et qu'ils étaient plutôt absents de l'hétérochromatine des centromères et des péricentromères (Kulikova *et al.*, 2001).

En 2011, l'obtention et l'assemblage de la version Mt3.5 du génome de *Medicago truncatula* ont été effectués grâce à la carte génétique réalisée à partir de 93 individus en F2 issus du croisement entre A17 et A20 (Choi *et al.*, 2004) ainsi qu'en séquençant majoritairement par la méthode de Sanger 2,536 BACs : 246 Mb ont été assemblées grâce aux chevauchements des BACs (Bacterial Artificial Chromosomes), 104,2 Mb n'étaient pas ancrées dans la pseudomolécule et ont été séquencées par séquençage Illumina à une profondeur de 40X. Ainsi, environ 94% des gènes exprimés étaient séquencés, soit 62 388 gènes prédits par le consortium IMGAG (en utilisant le pipeline EuGene) dont 14 322 gènes annotés (Young *et al.*, 2011). En 2014, le nouvel assemblage du génome de *Medicago truncatula* (Mt4.0) incorpore des séquences obtenues par les méthodes Illumina (>50X), Sanger et 454 et a été réalisé à partir de la carte génétique de la population de RILs LR4 (A17xDZA315.16), population développée au sein du laboratoire. Ce nouvel assemblage a permis d'ancrer 75,8 Mb des 104,2 Mb non ancrées de la version Mt3.5 : la longueur totale du génome obtenu est de 384,5 Mb (soit un ancrage de 93% des séquences contre 71% pour la version Mt3.5, **Figure A-34**). L'annotation de ce génome a été réalisée en utilisant les pipelines EVM et MAKER, et a permis de mettre en évidence la présence de 50 894 gènes, soit 82% des gènes annotés sur la version MT3.5 du génome (31 661 gènes à haute confiance et 19 233 à faible confiance) (Tang *et al.*, 2014).

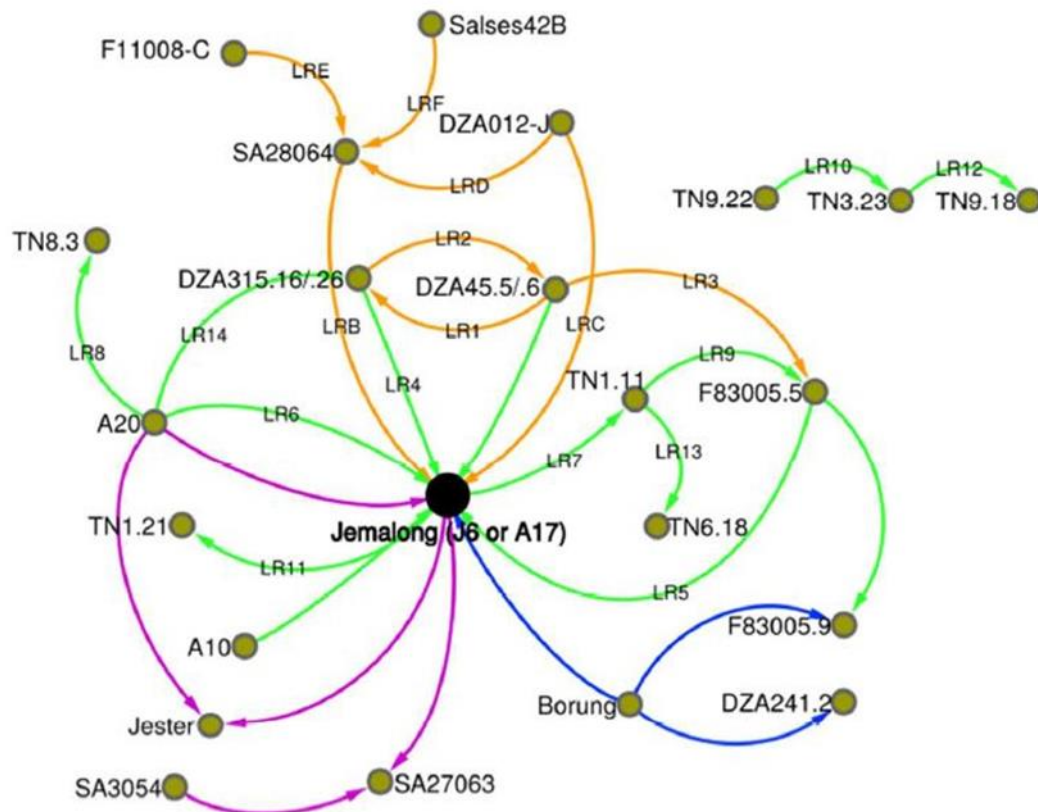


Figure A-35 : Populations de RILs existantes chez *Medicago truncatula* (extrait de Garmier *et al.*, 2017).

Les couleurs des flèches correspondent aux groupes ayant produits les populations. En violet, croisements réalisés par les groupes australiens. En orange, croisements réalisés par l'INRA-Montpellier. En bleu, croisements réalisés par l'INRA-Rennes. En vert, croisements réalisés par l'Université de Toulouse/CNRS/INRA en collaboration avec le Centre de Biotechnologies de Borj Cédria (CBBC, Tunisie).

De plus, le génome de R108 (fond génétique duquel sont issus les mutants *Tnt1*) a également été séquencé et assemblé.

b. Populations de RILs et cartes génétiques

Les populations de RILs et les cartes génétiques ont été importantes afin de pouvoir réaliser l'assemblage du génome de *Medicago truncatula*. L'établissement des cartes génétiques a nécessité l'identification de nombreux marqueurs microsatellites (ou SSR) chez l'ensemble des lignées parentales (Mun *et al.*, 2006). La mise en évidence de QTLs expliquant la variation phénotypique des caractères étudiés est une autre de leur application (Thoquet *et al.*, 2002). La **Figure A-35** illustre les populations de RILs actuellement développées ou en développement (Garmier *et al.*, 2017). Elles ont déjà permis l'identification de QTLs majeurs dans la réponse aux stress biotiques ou abiotiques (**Tableau A-9**). Ainsi par exemple, en plus des QTLs de résistance à *Verticillium* sp., la population LR5 (A17xF83005.5) a permis l'identification de QTLs de tolérance au sel (Arraouadi *et al.*, 2012), et de QTLs de résistance à *Colletotrichum trifolii*, *Aphanomyces euteiches* et *Ralstonia solanacearum* (Yang *et al.*, 2007; Djébali *et al.*, 2009; Ben *et al.*, 2013b). La population LR3 (F83005.5xDZA45.5) a été utilisée pour l'identification de QTLs de résistance à *Aphanomyces euteiches* et de tolérance au froid (Pilet-Nayel *et al.*, 2009; Tayeh *et al.*, 2013). La population LR7 (TN1.11xA17) a été utilisée pour l'identification de QTLs de tolérance à la sécheresse (Kadri *et al.*, 2017).

c. Collection de mutants

Plusieurs collections de mutants sont disponibles chez *Medicago truncatula* : mutants d'insertion *Tnt1*, mutants de délétion FNB, et mutants EMS (Kang *et al.*, 2016). La collection de mutants d'insertion *Tnt1* (Transposable element of *Nicotiana tabacum* cell type 1, <https://medicago-mutant.noble.org>) générée par The Nobel Foundation dans le fond génétique R108 compte 21 700 lignées mutantes comportant 520 000 insertions aléatoires (Cheng *et al.*, 2014). Initialement, cinq copies de ce rétrotransposon d'une longueur de 5,3kb ont été insérées par transformation génétique foliaire de R108. Le rétrotransposon a la capacité de se dupliquer et est mobile durant la régénération de plantes *in-vitro* : entre 4 et plus de 30 insertions ont été observées. Une fois la plante régénérée (R0), le rétrotransposon s'inactive (la mobilité de l'insert est due au stress causé par les phytohormones lors de la régénération *in-vitro*), les régions flanquant les insertions *Tnt1* sont identifiées par séquençage après PCR inverse ou PCR asymétrique, permettant ainsi la caractérisation de la collection. L'objectif de la fondation est d'atteindre 22 000 lignées contenant des insertions dans 90% des gènes de *Medicago truncatula*. Ces mutants sont notamment utilisés en génétique inverse (reverse genetics, validation fonctionnelle de gène) car peu de gènes sont mutés dans chaque lignée et l'identification des sites d'insertion n'est pas

Tableau A-9 : Liste des phénotypes quantitatifs étudiés en utilisant des populations de RILs de *Medicago truncatula* (extrait de Garmier *et al.*, 2017).

Les codes des populations de RILs correspondent à ceux de la Figure A-35.

Traits of interest	RIL Population	Reference
Developmental traits		
Time to flowering	LR1, LR5	Pierre <i>et al.</i> , 2008
Aerial morphogenesis, Forage quality	LR1, LR4, LR5, LR6	Julier <i>et al.</i> , 2007; Lagunes Espinoza <i>et al.</i> , 2012; Lagunes Espinoza and Julier, 2013
Hypocotyl length	LR5	Youssef <i>et al.</i> , 2016
Nitrogen nutrition	LR4	Moreau <i>et al.</i> , 2012
Fruit traits	LR3	Gorton <i>et al.</i> , 2012
Seed germination	LR4, LR5	Dias <i>et al.</i> , 2011
Seed vigour	LR1, LR4	Vandecasteele <i>et al.</i> , 2011
Seed mineral contents	LR4	Sankaran <i>et al.</i> , 2009
Response to biotic stress		
<i>Aphanomyces euteiches</i>	LR3, LR5	Pilet-Nayel <i>et al.</i> , 2009; Djébali <i>et al.</i> , 2009
<i>Colletotrichum trifolii</i>	LR4, LR5	Ameline-Torregrosa <i>et al.</i> , 2008
<i>Didymella pinodes</i>	LR4, LR5	Madrid <i>et al.</i> , 2014
<i>Erysiphe pisi</i>	LR4, LR5	Ameline-Torregrosa <i>et al.</i> , 2008
<i>Ralstonia solanacearum</i>	LR5	Vailleau <i>et al.</i> , 2007; Ben <i>et al.</i> , 2013b
<i>Verticillium</i> spp.	LR4, LR5	Ben <i>et al.</i> , 2013a; Negahi <i>et al.</i> , 2014
<i>Acyrtosiphon pisum</i> (pea aphid)	LR4, A17xA20	Klingler <i>et al.</i> , 2009; Stewart <i>et al.</i> , 2009; Guo <i>et al.</i> , 2012; Kamphuis <i>et al.</i> , 2016
<i>Acyrtosiphon kondoi</i> (blue green aphid)	LR6	Klingler <i>et al.</i> , 2009
<i>Therioaphis trifolii f. maculate</i> (spotted aphid)	LR6	Kamphuis <i>et al.</i> , 2013
Response to abiotic stress		
Salt tolerance	LR5, LR7	Arraouadi <i>et al.</i> , 2011a, 2012; Foroozanfar <i>et al.</i> , 2014
Freezing tolerance	LR3	Tayeh <i>et al.</i> , 2013; Avia <i>et al.</i> , 2013
Drought	LR5, LR7	Badri <i>et al.</i> , 2011; Kadri <i>et al.</i> , 2017

très compliquée étant donné que la séquence du rétrotransposon *Tnt1* est connue (Lucas *et al.*, 1995; d'Erfurth *et al.*, 2003; Tadege *et al.*, 2008).

Si la collection de mutants *Tnt1* permet d'obtenir la perte de fonction de gènes isolés, la collection de mutants de délétion FNB (fast neutron bombardment) permet d'obtenir une perte de fonction de plusieurs gènes d'intérêt en même temps. Le bombardement rapide de neutrons provoque des lésions au niveau de l'ADN végétal dont des délétions (d'une base à 30 kb) et d'autres types de mutations chromosomiques telles que des combinaisons d'insertion, délétions, substitutions et réarrangements (Rogers *et al.*, 2009). The Nobel Foundation et the John Innes Center ont généré une population de 156 000 lignées de mutants FNB dans le fond génétique A17 (<https://medicago-mutant.noble.org>). Ces mutants sont généralement utilisés en génétique directe (forward genetics) où la recherche des mutations/délétions est réalisée après observation du ou des phénotypes d'intérêt car cette technique de mutation permet d'obtenir une faible densité de mutation mais sur de grandes portions de génome (Tadege *et al.*, 2005).

La collection de mutants TILLING (targeting induced local lesions in genomes) a été obtenue par mutagenèse chimique à l'EMS de graines de *Medicago truncatula* A17. Cette dernière se caractérise par un grand nombre de mutations par plante ne ciblant pas préférentiellement les régions intragéniques du génome. Elle comprend deux populations : la première contient pratiquement 9 000 plantes dérivées de 4 500 plantes de génération M2 obtenues à partir de 500 plantes M1. La seconde contient 4 350 plantes de génération M2 dérivées à partir de 4 350 plantes M1 (Le Signor *et al.*, 2009). Le nombre important de mutations et le fait que les gènes mutés ne soient pas répertoriés sont parfois des freins à leur utilisation en génétique directe ou inverse. Cependant cette collection a l'avantage de créer des séries alléliques.

d. Atlas de gènes exprimés

Chez *Medicago truncatula*, il existe un atlas regroupant les profils d'expression des gènes dans différentes conditions de stress biotiques (inoculation par *Aphanomyces euteiches* ou *Ralstonia solanacearum* par exemple) et abiotiques (comme le NaCl) et dans différents organes (racines, nodules, tiges, pétioles, feuilles, bourgeons végétatifs, fleurs, graines et gousses). Ces données sont toutes issues de puces Affymetrix GeneChip® et ont été compilées sur le serveur Web *Medicago truncatula* Gene Expression Atlas (MtGEA, <https://mtgea.noble.org/v3/index.php>). A ses débuts en 2009, ce serveur regroupait les données issues de 156 puces dans 64 différentes conditions. La troisième version de ce serveur mis à jour en février 2015 compte aujourd'hui 739 puces et 274 conditions expérimentales différentes (He *et al.*, 2009).

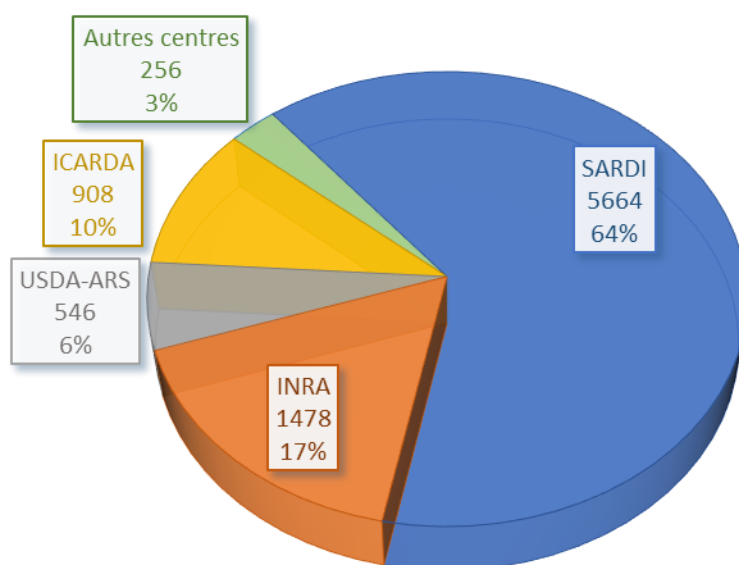


Figure A-36 : Répartition des accessions de *Medicago truncatula* dans les différents centres de ressources génétiques.

SARDI : South Australian Research and Development Institute

INRA : Institut National de Recherche Agronomique

ICARDA : International Center for Agricultural Research in the Dry Areas

USDA-ARS: United States Department of Agriculture - Agricultural Research Service

Quant à la base de données LegumeIP (<http://plantgrn.noble.org/LegumeIP/>), elle regroupe également la séquence génomique de cinq autres espèces de légumineuses (*Glycine max*, *Lotus japonicus*, *Phaseolus vulgaris*, *Cicer arietinum* et *Cajanus cajan*), permettant ainsi une recherche de syntenie entre ces différentes espèces de légumineuses. Un profil d'expression de gènes dans différentes conditions et dans différents organes issus de 550 puces chez *Medicago truncatula*, 962 puces chez *Glycine max*, 276 puces chez *Lotus japonicus* et 56 profils d'expression RNA-Seq chez *Cicer arietinum* est également disponible en ligne (Li *et al.*, 2012b).

e. Collections d'accessions naturelles

Quatre centres possèdent la majorité des collections d'accessions de *Medicago truncatula* (Nair *et al.*, 2006). Elles sont issues de prospections réalisées autour du bassin méditerranéen et dans des lieux aux conditions pédoclimatiques très différentes ainsi que des croisements biparentaux. La collection du SARDI (South Australian Research and Development Institute) est l'une des plus anciennes collections. En effet, *Medicago truncatula* est particulièrement bien adaptée au climat du Sud de l'Australie, et en tant que légumineuse, elle a été introduite dans les assolements pour sa capacité à fixer l'azote atmosphérique dans le sol (Crawford, 1970; Crawford *et al.*, 1989). La constitution d'un germoplasme afin d'améliorer les semences de *Medicago truncatula* a débuté en 1968. Ainsi d'après Genesys (<https://www.genesys-pgr.org>, portail regroupant des informations sur les ressources génétiques végétales agricoles et alimentaires), ce centre possédait 5 664 accessions de *Medicago truncatula* en octobre 2016. Les premières prospections ayant contribué à l'établissement de la collection de l'INRA de Montpellier ont débuté en 1985. En septembre 2017, elle comptait 1478 accessions. La collection de l'ICARDA (International Center for Agricultural Research in the Dry Areas, Syrie) comptait 908 accessions en mars 2017 et celle de l'USDA-ARS (United States Department of Agriculture - Agricultural Research Service) était composée en mars 2017 de 908 accessions. Sur un total de 8 852 accessions, 97% sont stockés dans un de ces quatre centres (**Figure A-36**). En plus de ces ressources, il existe des collections nationales : en Algérie, 110 populations ont été collectées (Abdelguerfi *et al.*, 1988), en Tunisie 14 populations composées de 170 lignées ont été prospectées (Badri *et al.*, 2007, 2011; Lazrek *et al.*, 2009) ainsi que 280 lignées issues d'une plaine saline dans la région de Soliman (Friesen *et al.*, 2014; Vu *et al.*, 2015; Moriuchi *et al.*, 2016).

A partir de ces différentes collections et en se basant sur des marqueurs génétiques principalement SSRs, des core collections ont été établies afin de conserver un maximum de biodiversité de l'espèce *Medicago truncatula* dans un nombre restreint d'accessions. Ainsi, l'INRA de Montpellier a établi une core collection de 192 accessions, l'USDA-ARS une core collection de 64 accessions et la SARDI une core collection de 64 accessions. Néanmoins, les collections de l'INRA et de la SARDI ont été créées à

partir d'un génotypage réalisé sur seulement 13 et 6 marqueurs neutres, ces collections ne représentent peut-être pas la biodiversité de l'espèce (Ronfort *et al.*, 2006; Ellwood *et al.*, 2006a; Han *et al.*, 2007, 2010).

f. Le projet *MtHapmap*

Le projet collaboratif *Medicago truncatula* Hapmap (<http://www.medicagohapmap.org/>) regroupe l'University of Minnesota, le National Center for Genome Resources (NCGR), le Boyce Thompson Institute (BTI), le J. Craig Venter Institute (JCVI) Hamline University, l'University of Southern California, INRA-Montpellier, ENSAT-Toulouse, and the Noble Foundation. Ce projet débuté en 2009 a pour objectif la découverte de SNPs au sein d'une collection de 330 lignées en utilisant la technologie Illumina (<http://www.medicagohapmap.org/hapmap/germplasm>). Trente de ces lignées ont été reséquencées avec une profondeur de 30X alors que les autres l'ont été par une profondeur de 5X. Les trente lignées séquencées à une plus grande profondeur ont été utilisées pour déterminer le déséquilibre de liaison (LD) chez *Medicago truncatula*. Le déséquilibre de liaison correspond à l'association non aléatoire de loci physiquement proches au sein d'un chromosome (Flint-Garcia *et al.*, 2003), et il est nécessaire de connaître cette distance afin d'utiliser un nombre suffisant et une densité correcte de SNPs pour conduire des études de génétique d'association. Chez *Medicago truncatula*, ce déséquilibre de liaison est de l'ordre de 5kb (Branca *et al.*, 2011).

Les SNPs découverts entre accessions 262 accessions de *Medicago truncatula* sont actuellement alignés sur la version Mtv4.0 et on en dénombre plus de 37 millions sur le génome *Medicago truncatula* soit environ un SNP tous les 450bp. L'obtention de ces SNPs a déjà permis de réaliser différentes études de génétique d'association sur des traits agronomiques et symbiotiques, sur l'adaptation climatique ainsi que sur la résistance à *Aphanomyces euteiches*. Pour l'ensemble de ces phénotypes, des gènes candidats ont pu être identifiés (Stanton-Geddes *et al.*, 2013; Bonhomme *et al.*, 2013; Yoder *et al.*, 2014).

Ce projet met également à disposition de la communauté scientifique des SNPs obtenus sur deux souches différentes de *Sinorhizobium*.

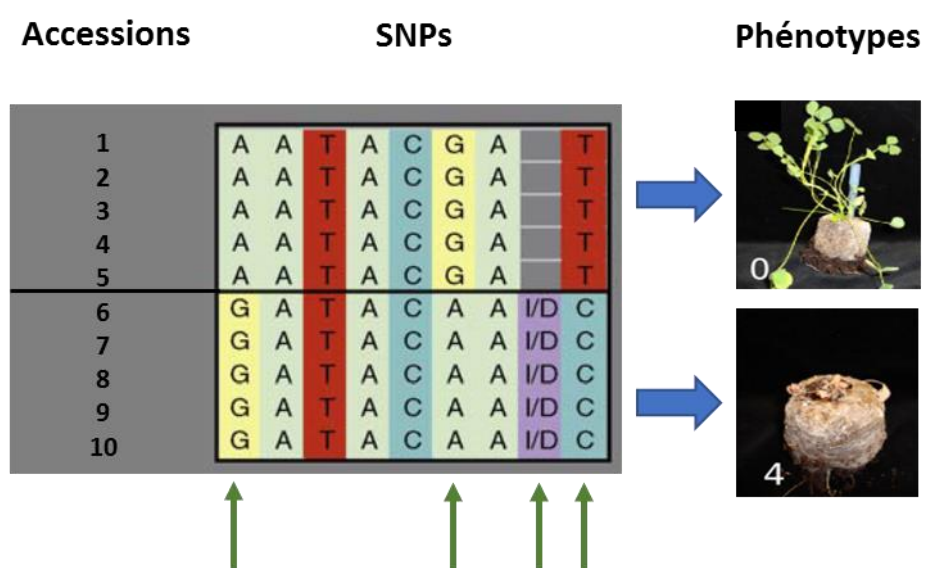


Figure A-37 : Principe général de l'étude de génétique d'association (adapté de Rafalski, 2010).

L'association entre les phénotypes observés et les marqueurs génétiques est testée. Dans cet exemple, les accessions 1 à 5 sont résistantes au pathogène, les accessions 6 à 10 sont sensibles. D'après les haplotypes (suite de SNPs) de cette figure, les SNPs désignés par une flèche verte sont polymorphes entre les deux groupes d'accessions, ils peuvent expliquer le phénotype observé.

V. Les études de génétique d'association

1. Principe des études de génétique d'association

La cartographie d'association (ou cartographie du déséquilibre de liaison) correspond à l'analyse statistique de l'association entre génotypes (généralement des SNPs) et phénotypes obtenus sur une collection d'individus. Deux types de méthode sont développées : l'étude de l'association de gènes candidats ou l'étude de génétique d'association à l'échelle du génome entier. La première méthode implique la connaissance précise du contrôle génétique et biochimique du trait étudié. Pour l'étude de génétique d'association (GWAS - Genome Wide Association Study), l'association entre les marqueurs génétiques répartis sur l'ensemble du génome et le trait étudié est testée (**Figure A-37**). La diminution des coûts de séquençage a permis la démocratisation de l'utilisation du GWAS afin d'identifier les déterminants génétiques à l'origine de la biodiversité des traits observés (Vilhjálmsson and Nordborg, 2012). Initialement développées chez l'homme où l'étude de larges populations en ségrégation était impossible, ces études sont aujourd'hui également conduites chez les plantes modèles et cultivées. Les plantes autogames telles qu'*Arabidopsis thaliana*, *Medicago truncatula* ou *Oryza sativa* sont particulièrement adaptées aux études de génétique d'association. En effet, le maintien de lignées pures est facilité et les mesures phénotypiques peuvent être répétées sur des individus génétiquement identiques (Korte and Farlow, 2013). Afin d'obtenir des résultats statistiques les plus fiables possibles et de diminuer les fausses associations, les modèles linéaires mixtes utilisés en génétique d'association prennent en compte la structure des populations, ainsi que l'apparentement entre individus. La densité et le nombre de marqueurs utilisés dépendent du LD de l'espèce : chaque bloc de LD doit contenir au moins plusieurs SNPs afin de pouvoir identifier des gènes candidats à l'intérieur de ces blocs (Rafalski, 2010).

Tout comme le GWAS, la recherche de QTL reste une méthode puissante pour identifier des régions de génome ségrégeant avec un trait particulier. Néanmoins, cette méthode souffre de deux limitations dont s'affranchissent les études GWAS : elle n'est basée que sur la diversité allélique présente chez deux parents et la résolution de la carte génétique est contrainte par le taux de recombinaison au sein de la population de RILs (Korte and Farlow, 2013). De plus, les études de génétique d'association permettent également de détecter des traits qualitatifs. Les avantages et limites du GWAS seront détaillés dans la partie suivante.

2. Avantages et limites des études de génétique d'association

Les caractéristiques des organismes utilisés et leur nombre vont déterminer la résolution et la puissance de l'analyse GWAS. Le contrôle génétique des phénotypes étudiés, le choix des individus utilisés et les méthodes d'analyse des résultats sont présentés ci-après.

a. Contrôle génétique des phénotypes étudiés

Dans le cas de traits contrôlés par un petit nombre de loci à effets importants, le GWAS est une méthode adaptée. C'est le cas par exemple d'une majorité de traits sous sélection biotique tels que les résistances qualitatives aux pathogènes (Louthan and Kay, 2011). Les traits à contrôle génétique plus complexe sont eux plus difficiles à identifier par GWAS. En effet, ces traits peuvent être contrôlés par beaucoup de variants rares à effets larges sur le phénotype, par beaucoup de variants communs à petits effets sur le phénotype ou par un mélange de ces deux catégories de variants. Les variants causals du trait sont alors regroupés au niveau d'un seul gène, d'un petit nombre de gènes ou parmi un grand nombre de gènes. La puissance d'une analyse GWAS pour identifier une association entre un trait et un SNP repose en partie sur la variance phénotypique due à l'effet de ce SNP au sein de la population. La variance phénotypique est déterminée par l'importance de la différence de l'effet phénotypique (effet taille) entre plusieurs variants et de leur fréquence allélique au sein d'une population. Ainsi, les variants rares ou à petits effets phénotypiques sont mal détectés (Asimit and Zeggini, 2010; Gibson, 2012). De plus, les variants rares sont généralement fortement ou complètement associés à d'autres variants rares non causals du trait observé au sein des mêmes individus. Ainsi un unique locus causal peut provoquer l'apparition d'associations dites synthétiques. Les variants rares ne sont pas la seule source de ces faux-positifs, mais ils provoquent ensuite des difficultés d'interprétation des résultats (Dickson *et al.*, 2010; Lipka *et al.*, 2015).

Lorsque des interactions entre loci (épistasie) ou entre loci et environnement existent pour le phénotype étudié, les modèles classiques utilisés en GWAS ne sont pas adaptés (modèles linéaire mixte ou modèle général linéaire). Pour identifier des interactions entre gènes, des modèles testant l'association entre des couples de SNPs et les phénotypes ont été mis au point, mais le nombre de tests à effectuer est considérable (Marchini *et al.*, 2005; Cordell, 2009; Kam-Thong *et al.*, 2011). Par exemple, malgré des améliorations, l'algorithme développé par Kam-Thong *et al.* nécessite 40 heures de calculs (sur un cluster 48 AMD Opteron 6172 2.1 GHz CPU cores) sur un jeu de données constitué de 491 patients, 536 750 SNPs et d'un phénotype quantifiant la sévérité de leur dépression. A l'issue de ces calculs, l'association entre $1,44.e^{11}$ paires de SNPs et le phénotype a été testée et 1 137 450 interactions entre gènes candidats ont été détectées (Kam-Thong *et al.*, 2011). Afin de pallier aux

problèmes computationnels, d'autres études ont été menées en réduisant le nombre de tests aux seuls loci associés au trait étudié (Oh *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2015b). Par exemple, après avoir identifié par une étude de génétique d'association des gènes candidats à la résistance à *Fusarium virguliforme* (pathogène responsable du syndrome de la mort subite) chez le soja (*Glycine max*) en utilisant des phénotypes de progression de la maladie tels que l'AUDPC, les auteurs ont ensuite recherché l'existence d'épistasie entre ces gènes candidats. Ainsi, à partir des douze SNPs associés à la résistance à *Fusarium virguliforme*, ils ont testé cinq combinaisons de un, trois et cinq SNPs et ont pu mettre en évidence douze interactions significatives. Alors que les SNPs isolés identifiés par génétique d'association expliquaient entre 12 et 31% de la variance phénotypique, les douze interactions significatives expliquent entre 24 et 52% de cette variance phénotypique (Zhang *et al.*, 2015b).

Travailler sur des plantes autogames est un avantage pour étudier les interactions entre gène et environnement (GxE) puisque des évaluations phénotypiques peuvent avoir lieu et être répétées dans des conditions environnementales différentes. Des modèles mixtes considérant à la fois la variance d'un trait par individu et la variance entre différents traits simultanément ont été développés afin d'analyser des phénotypes corrélés. Ainsi, en considérant la mesure d'un phénotype dans deux environnements différents comme deux phénotypes corrélés, ces modèles peuvent être utilisés afin de tester l'effet d'interaction GxE (Thomas, 2010). Ils permettent de détecter des associations précédemment inconnues et de décomposer des effets observés en une composante génétique et une composante environnementale. Cette méthode se révèle plus puissante pour détecter des interactions génotype-environnement pour lesquelles les allèles ont un effet opposé dans les différents environnements plutôt que des allèles dont l'effet est graduel entre environnements (Korte *et al.*, 2012). Un exemple d'étude de l'interaction GxE en utilisant ce type de modèle pour le GWAS a été réalisé sur le phénotype du temps de floraison chez *Arabidopsis thaliana*, données acquises sur 473 accessions, dans des conditions de culture mimant deux lieux et deux saisons (printemps et été en Espagne et en Suède (Li *et al.*, 2010)). Peu d'effets d'interactions ont été identifiés : sur 41 SNPs significatifs, 3 seulement sont dus à des effets d'interaction GxE (un SNPs sur le chromosome 5 qui n'est pas relié à un gène candidat évident pour le phénotype de floraison, et les deux autres SNPs sont sur le chromosome 1, au sein du gène *FRS6*, gène impliqué dans la réponse des phytochromes A en réponse à la lumière rouge lointaine). Ce dernier candidat avait déjà été identifié par les quatre analyses GWAS indépendantes réalisées sur les quatre environnements par Li et ses collaborateurs. Sur les 38 SNPs restants, 28 ont été retrouvés en commun entre les deux études basées sur les modèles GWAS de Li et ses collaborateurs et le modèle GWAS considérant les phénotypes obtenus dans les quatre environnements comme des phénotypes corrélés. Les 10 autres SNPs ont uniquement été identifiés par Li et ses collaborateurs. Dans ce cas pratique, le gène candidat lié à l'interaction génotype

environnement a pu être identifié même si tous les gènes candidats issus de l'étude initiale par Li et ses collaborateurs n'ont pas tous été retrouvés (Korte *et al.*, 2012).

b. Caractéristiques des individus utilisés pour le GWAS

De bons résultats ont été obtenus par les analyses GWAS réalisées sur des plantes autogames telles qu'*Arabidopsis thaliana* en n'utilisant qu'un petit nombre d'accessions (parfois moins de 100) suggérant ainsi que les traits étudiés étaient régis par un petit nombre de loci expliquant une grande proportion de la variance phénotypique (Atwell *et al.*, 2010). Cette situation est différente chez l'homme, où des milliers d'individus sont nécessaires pour détecter un grand nombre de loci à petits effets (Bodmer and Bonilla, 2008) mais aussi chez les animaux (Flint and Mackay, 2009) ou encore le maïs (Tian *et al.*, 2011). Ces différences d'architecture génétique pourraient s'expliquer par les différences de types de reproduction (autogamie *versus* allogamie, le déséquilibre de liaison est plus grand chez les autogames que chez les allogames).

L'augmentation de la taille d'un échantillon permet d'augmenter la puissance du GWAS. Les individus sélectionnés pour ces études peuvent être originaires de zones géographiques très différentes ou bien appartenir à des populations très proches mais elles doivent présenter une variabilité phénotypique pour le trait étudié. Les accessions les plus distantes géographiquement permettent d'augmenter la variance génétique mais elles peuvent également apporter une hétérogénéité génétique : si l'étude réalisée porte sur l'adaptation locale, les variants expliquant le trait peuvent être différents car ils peuvent provenir de zones géographiques différentes (Li *et al.*, 2010). Cette hétérogénéité réduit alors la puissance de l'étude. L'utilisation d'un échantillon provenant d'une même population a pour avantage de réduire cette hétérogénéité, mais il est aussi possible que les variants expliquant le trait restent à une faible fréquence ou soient absents, ne permettant pas d'obtenir des résultats concluants (Korte and Farlow, 2013). En prenant en compte ces limitations, deux études réalisées sur l'adaptation locale des plantes en utilisant une portion de population d'*Arabidopsis thaliana* ou un grand nombre d'accessions représentant la biodiversité de cette espèce ont permis d'obtenir des résultats intéressants. En effet, les mécanismes génétiques de la compétition intraspécifique et interspécifique (*Poa annua*, *Stellaria media*, *Trifolium repens* et *Veronica arvensis*, espèces naturellement associées à *Arabidopsis thaliana*) ont été étudiés chez 48 accessions d'*Arabidopsis thaliana* appartenant à la population TOU-A. Pour cela, huit phénotypes liés aux stades de développement phénologique d'*Arabidopsis thaliana* (apparition de la hampe florale, intervalle entre floraisons et apparition de la hampe florale, longueur de la période de reproduction), à l'accumulation des ressources (diamètre maximal des rosettes) ainsi que des paramètres liés à l'architecture et à la dispersion des graines (nombre de branches basales, nombre de branches primaires avec des fruits, hauteur entre le sol et le

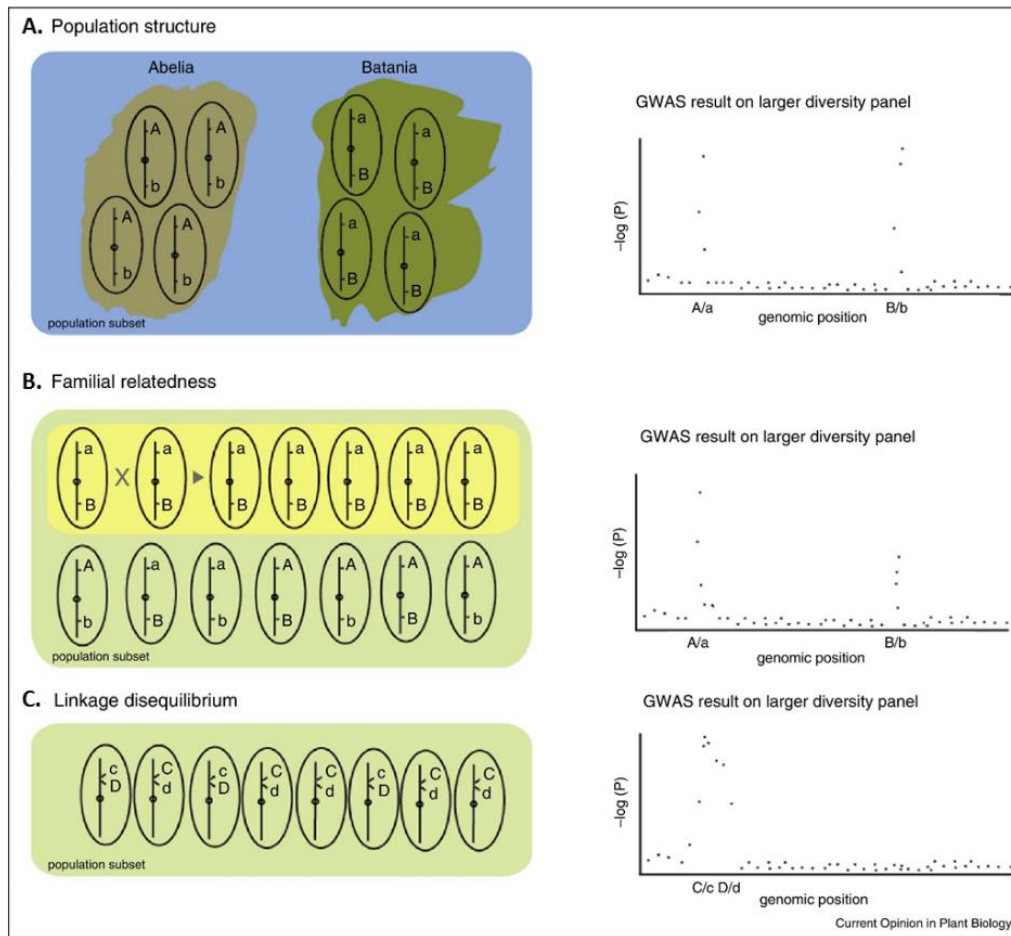


Figure A-38 : Sources communes d'association entre phénotypes et allèles non-causaux dans les études de génétique d'association réalisées sans correction de structure de population, d'appariement entre individus et dans le cas d'un fort déséquilibre de liaison (extrait de Lipka *et al.*, 2015).

A. Une population composée d'accessions provenant de deux îles, Abelia et Batania est utilisée pour étudier la tolérance à la sécheresse. Abelia possède un climat sec et aride alors que Batania possède un climat humide où les champignons sont des pathogènes communs. Une illustration de ces populations est présentée en haut à gauche de ce schéma. L'allèle A confère une tolérance à la sécheresse, a ne la confère pas. Le second allèle B, non lié à A confère la résistance à un champignon et b ne la confère pas. Sans correction du modèle par la structure de population, une fausse association entre le locus B/b et la tolérance à la sécheresse est observée après l'analyse GWAS à cause de cette structure. Les allèles sont fixés dans les deux sous-populations, ils apparaissent alors comme deux pics de significativité comparable sur le Manhattan plot.

B. Imaginons des fermiers et des sélectionneurs qui historiquement cultiveraient la même espèce présentée en A, et qu'une collection de différentes variétés de cette espèce cultivée provenant de différents lieux soit génotypée. Ici, les populations ne sont pas isolées géographiquement mais beaucoup de cultivars dans ce panel sont apparentés. Le cadre vert représente ce panel et le cadre jaune est constitué d'accessions issues d'un croisement entre deux parents originaires de Batania et possédant l'haplotype aB. Puisque la descendance de ce croisement est fixée au niveau de ces loci, si le sélectionneur ne corrige pas l'appariement entre les accessions, une fausse association est visible pour l'allèle B/b sur le Manhattan plot de la tolérance à la sécheresse.

C. Considérons une population contenant deux différents loci, C/c (locus causant le phénotype observé) et D/d (locus ne causant pas le phénotype observé), loci présentant entre eux un fort déséquilibre de liaison. En conséquence de ce fort LD, un fort et large pic d'association est visible, il comprend à la fois le locus C/c, locus causal du phénotype et le locus D/d qui n'est pas responsable du phénotype observé.

premier fruit) ont été observés dans différentes conditions de compétition. Les études de génétique d'association sur ces traits ont ensuite permis de mettre en évidence cinq régions génomiques associées à la compétitivité chez *Arabidopsis thaliana* (Baron *et al.*, 2015). Au contraire, pour étudier des traits soulignant l'adaptation locale d'*Arabidopsis thaliana* à son environnement, le temps de floraison de 473 accessions a été observé. L'origine de ces accessions recouvre l'aire de répartition naturelle d'*Arabidopsis thaliana*, elles ont été sélectionnées de façon à maximiser leur diversité génétique et d'éliminer les accessions aux génotypes proches (un set de 149 SNPs a été utilisé pour cette sélection). Ces observations ont été réalisées dans quatre différents environnements, et quatre études de génétique d'association ont mis en évidence 12 QTLs impliqués dans le temps de floraison (Li *et al.*, 2010). Les études GWAS peuvent donc être conduites avec succès à l'échelle d'une espèce entière ou au sein d'une même population afin d'identifier l'adaptation locale des individus à leur environnement biotique et abiotique.

Après sélection des accessions en fonction des traits qui vont être étudiés, l'apparement entre accessions et la structure des populations de l'espèce utilisée doivent être prises en considération. La **Figure A-38** illustre les problèmes rencontrés lorsque la structure de la population, l'apparement entre individus et l'existence d'un fort déséquilibre de liaison sont présents. Dans le cas **Figure A-38-A**, une population composée d'accessions d'une plante quelconque provenant de deux îles, Abelia et Batania est utilisée pour étudier la tolérance à la sécheresse. Abelia possède un climat sec et aride alors que Batania possède un climat humide où les champignons sont des pathogènes communs. Une illustration de ces populations est présentée en haut à gauche de la **Figure A-38**. L'allèle A confère une tolérance à la sécheresse, a ne la confère pas. Le second locus B, non lié à A confère la résistance à un champignon et b ne la confère pas. L'analyse GWAS est réalisée sans correction de structure de population, une fausse association entre le locus B/b et la tolérance à la sécheresse est observée à cause de cette structure. Les allèles sont fixés dans les deux sous-populations, ils apparaissent alors comme deux pics de significativité comparable sur le Manhattan plot. Des structures de populations comme celle-ci peuvent résulter d'une sélection diversifiante, d'un isolement géographique ou encore de la fixation des allèles au sein des sous-populations (cas présenté ici) (Lipka *et al.*, 2015). Un autre exemple des problèmes de structure de population et d'étude de génétique d'association peut être illustré chez l'homme par la capacité à utiliser des baguettes pour se nourrir et l'antigène A1 des leucocytes humains. Cette étude a été réalisée à San Francisco, ville où une forte communauté de personnes originaires du Sud-Est de l'Asie est présente. Or, l'antigène A1 des leucocytes humains est un allèle commun chez les personnes originaires d'Asie du Sud-Est, et si la structure de la population humaine n'est pas prise en compte, une fausse association entre capacité à utiliser les baguettes et l'antigène A1 des leucocytes humains est observée alors que cette capacité n'a aucun lien avec le système immunitaire humain (Vilhjálmsdóttir and Nordborg, 2012).

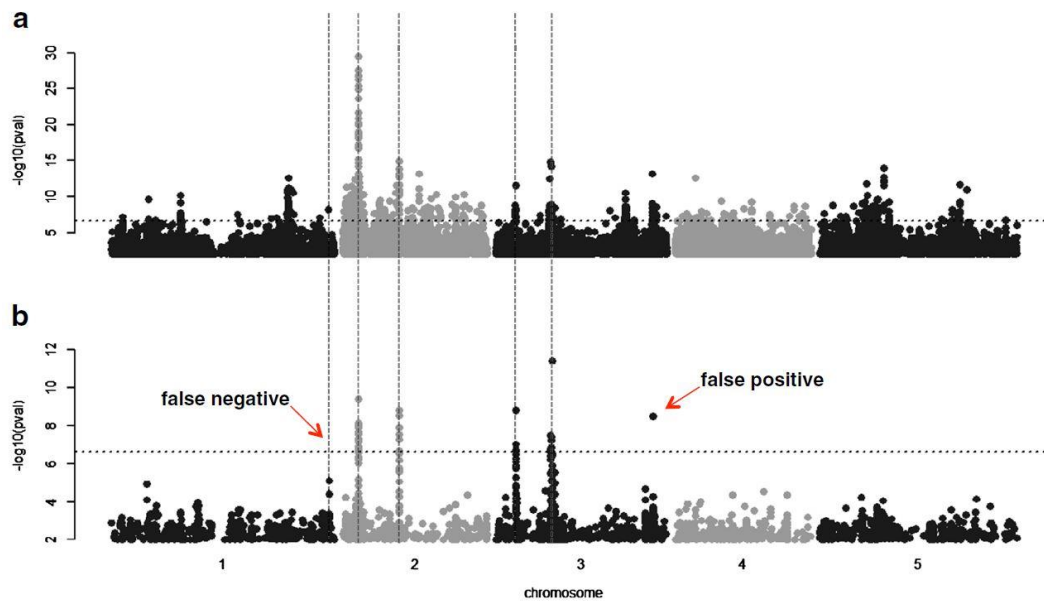


Figure A-39 : Amélioration des performances du GWAS en prenant en compte la structure et l'appariement entre individus (extrait de Korte and Farlow, 2013).

Manhattan plots obtenus par simulation d'un trait chez *Arabidopsis thaliana* : chacun des SNPs est représenté en fonction de sa position physique sur les chromosomes d'*Arabidopsis thaliana* (axe des abscisses) et de la valeur de son association avec le trait simulé (axe des ordonnées). Cinq marqueurs causals expliquant chacun 10% du phénotype ont été choisis. a : modèle linéaire général. b : modèle linéaire mixte incluant les matrices d'apparement et de structure de population. Le modèle linéaire général augmente la valeur des $p\text{-values}$ et les cinq marqueurs liés aux traits ne sont pas tous ceux avec la plus grande association. Le modèle linéaire mixte est meilleur, les cinq marqueurs causals sont les plus associés mais deux faux positifs apparaissent également.

Pour illustrer l'appariement entre accessions (**Figure A-38-B**), imaginons des fermiers et des sélectionneurs qui historiquement cultiveraient la même espèce présentée en A, et qu'une collection de différentes variétés de cette espèce cultivée provenant de différents lieux soit génotypée. Le germoplasme est utilisé dans ce cas pour diversifier les sources de résistance à la sécheresse. Ici, les populations ne sont pas isolées géographiquement mais beaucoup de cultivars dans ce panel sont apparentés. Le cadre vert représente ce panel et le cadre jaune est constitué d'accessions issues d'un croisement entre deux parents originaires de Batania et possédant l'haplotype aB. Puisque la descendance de ce croisement est fixée au niveau de ces loci, si le sélectionneur ne corrige pas l'appariement entre les accessions, une fausse association est visible pour l'allèle B/b sur le Manhattan plot de la tolérance à la sécheresse (Lipka *et al.*, 2015).

L'influence du déséquilibre de liaison présent chez les individus étudiés est présentée **Figure A-38-C**. Considérons une population contenant deux différents loci, C/c (locus causant le phénotype observé) et D/d (locus ne causant pas le phénotype observé), loci présentant entre eux un fort déséquilibre de liaison. En conséquence de ce fort LD, un fort et large pic d'association est visible, il comprend à la fois le locus C/c, locus causal du phénotype et le locus D/d qui n'est pas responsable du phénotype observé. Les génomes ou les régions génomiques présentant un fort LD ont une résolution limitée et un nombre plus faible de marqueurs peut être utilisé (Lipka *et al.*, 2015).

Pour résoudre les problèmes d'appariement entre accessions et la structure des populations de l'espèce étudiée, le modèle linéaire mixte prend en compte la structure de la population et estime notamment la proportion de covariance phénotypique due à l'appariement entre individus (une matrice d'appariement (kinship) est ajoutée en effet aléatoire dans le modèle, une matrice de structure de population est ajoutée en effet fixe). L'utilisation de ces modèles a permis la diminution du nombre de faux positifs dans les études de génétique d'association (**Figure A-39**, Korte and Farlow, 2013).

c. Analyse des résultats du GWAS

La méthode la plus simple et souvent très conservative consiste à déterminer le seuil de significativité des *p-values* associées au SNPs par une correction des tests multiples de Bonferroni (le seuil de 5% est souvent utilisé) et à inspecter les QQ-plots (ou diagrammes quantile-quantile) et les Manhattan plots afin de vérifier si les *P-values* ne sont ni sous-estimées ni surexprimées. Les QQ-plots permettent de vérifier que les *P-values* attendues et les *P-values* calculées sont proches (ces *P-values* suivent une loi uniforme). Les Manhattan plots sont une représentation des *P-values* de chacun des SNPs en fonction de leur position physique sur les chromosomes. L'apparition d'un grand nombre de SNPs isolés et

possédant une *P-value* très significative témoigne généralement d'un problème de modèle d'analyse (Korte and Farlow, 2013).

Un autre critère plus informatif pour estimer la performance du modèle est de calculer la proportion de faux positifs et de faux négatifs dans un jeu de données simulées en exprimant le FDR (false discovery rate) (Korte and Farlow, 2013).

Enfin, dans un dernier cas, certains auteurs prennent le parti d'étudier les 200 meilleurs *p-values* obtenues lors de leur analyse de génétique d'association. Cette stratégie a notamment été utilisée dans le cadre d'une étude de génétique d'association visant à déterminer les mécanismes génétiques impliqués dans la nodulation et dans la floraison chez *Medicago truncatula* (Stanton-Geddes *et al.*, 2013).

VI. Objectifs de la thèse

A ce jour, peu de gènes de résistance quantitative aux maladies, dont les maladies racinaires, ont été clonés. De même, aucun gène de résistance quantitative à *Verticillium alfalfae* n'a été décrit. La plante modèle des légumineuses *Medicago truncatula* et le pathogène *Verticillium alfalfae* V31-2 ont été choisis afin d'identifier des gènes de résistance à *Verticillium alfalfae*. En effet, les légumineuses présentent des intérêts agronomiques et écologiques majeurs et elles sont des plantes hôtes de *Verticillium* sp.

1. Etude de la biodiversité de la réponse à *Verticillium alfalfae* chez *Medicago truncatula* par la recherche de sources de résistance

Le premier objectif de cette thèse est de déterminer s'il existe des sources de résistance à *Verticillium alfalfae* V31-2 au sein de la biodiversité naturelle de *Medicago truncatula* afin de savoir si une étude de génétique d'association pourrait être utilisée pour l'identification de gènes de résistance à *Verticillium* chez *Medicago truncatula*. Pour cela, 261 lignées de *Medicago truncatula* originaires du pourtour méditerranéen ont été inoculées et le développement des symptômes foliaires de la maladie a été suivi pendant 4 semaines. Ces accessions sont originaires de régions aux conditions pédo-climatiques très différentes : 246 font partie du projet Hapmap et leurs SNPs sont disponibles, et 15 autres accessions sont originaires de différentes régions tunisiennes et ne font pas parties du projet Hapmap.

Pour caractériser le plus finement possible les différents mécanismes de résistance à *Verticillium alfalfae*, un réisolement du pathogène a été réalisé à l'issue des 4 semaines de suivi de symptômes. En associant le taux de réisolement au phénotype de développement des symptômes de maladies, différents niveaux et types de résistance des accessions ont été mis en évidence : lignée résistante (pas ou peu de symptômes et pas de colonisation des parties aériennes par *Va* V31-2), partiellement résistante (pas ou peu de symptômes et peu de colonisation des parties aériennes par *Va* V31-2), tolérante (pas ou peu de symptômes et colonisation des parties aériennes par *Va* V31-2) ou sensible (lignée montrant beaucoup de symptômes, avec ou sans colonisation des parties aériennes par *Va* V31-2).

Une recherche de sources de résistance à *Verticillium alfalfae* V31-2 a également été effectuée au sein de la population tunisienne de Soliman de *Medicago truncatula*. Cette population ayant déjà été décrite pour ses réponses contrastées à la tolérance à la salinité, l'objectif de son étude est de mettre en évidence s'il existe une variabilité locale de la résistance à *Verticillium alfalfae* V31-2. Pour cela, la

réponse à *Verticillium alfalfae* V31-2 a été étudiée chez 90 lignées de façon identique à celle décrite ci-dessus.

2. Identification de gènes candidats à la résistance à *Verticillium alfalfae* chez *Medicago truncatula*

Après la mise en évidence d'une variabilité dans la réponse à *Verticillium* et de l'existence de sources de résistance à *Verticillium alfalfae* au sein de l'espèce ainsi qu'au sein de la population Soliman, le second objectif de cette thèse a été l'identification de gènes candidats à la résistance à la verticilliose. Cette identification a été effectuée en utilisant une étude de génétique d'association sur l'ensemble du génome (GWAS). L'utilisation de cette méthode combinée au nombre important de lignées testées et à la densité des SNPs a pour but d'identifier un nombre restreint de gènes candidats par rapport à ce qui avait été décrit à partir des études QTLs sur des populations biparentales ainsi qu'une vue plus exhaustive des différents contrôles génétiques impliqués dans la résistance à *Verticillium alfalfae* V31-2.

L'étude de génétique d'association sur la population Soliman a pour but d'identifier les déterminismes génétiques de la résistance à la verticilliose dans cette population issue d'une zone géographique restreinte et caractérisée par des niveaux de tolérance à la salinité différents. Cela pourrait permettre de mettre en évidence d'autres sources de résistance à *Verticillium alfalfae* V31-2 tout en s'affranchissant des problèmes de structures de population pouvant être rencontrés lors des études de génétiques d'association.

3. Mise en évidence du rôle de certains gènes candidats à la résistance à *Verticillium alfalfae* chez *Medicago truncatula* et chez *Lotus japonicus*

La confirmation des résultats obtenus par génétique d'association passe par une validation expérimentale du rôle des gènes candidats dans la résistance à *Verticillium alfalfae*. Un des objectifs a donc été de mettre au point un système expérimental permettant d'étudier le rôle des gènes candidats dans la résistance à la verticilliose. La transformation stable de *Medicago truncatula* n'étant pas très facile, des plantes chimériques de *Medicago truncatula* (aux racines transgéniques) ainsi qu'un système de culture de racines transgéniques *in vitro* ont été utilisés. Au sein de ces plantes, les gènes candidats étudiés ont été surexprimés ou leur expression a été éteinte en utilisant des micro-ARNs artificiels ciblant les gènes candidats. De plus, des mutants *Tnt1* (mutants knock-out) dans l'un des gènes candidats ont été identifiés et caractérisés. Une validation fonctionnelle des gènes candidats par clonage positionnel en utilisant des individus des populations de RILs LR4 et LR5 recombinant sous le

QTL majeur a été réalisée. Afin de caractériser plus finement le gène candidat validé (Medtr7g070480, gène encodant une protéine SEC14), une analyse de son expression un jour après inoculation chez un panel de quatorze accessions de *Medicago truncatula* sensibles et résistantes à *Verticillium alfalfae* ainsi qu'une étude des haplotypes au sein de ce gène ont également été réalisées.

En parallèle des travaux réalisés chez *Medicago truncatula*, la mise au point de pathosystèmes hétérologues tels que *Arabidopsis thaliana* / *Verticillium alfalfae* ou encore *Lotus japonicus* / *Verticillium alfalfae* a été réalisée, comme une aide éventuelle à la validation du rôle de ces gènes candidats dans la résistance à la verticilliose.

B. MATERIEL ET METHODES

Tableau B-1 : Génotypes des lignées RILs des populations LR4 et LR5 en génération F5 au niveau du QTL majeur de résistance à *Verticillium alfalfae* V31-2 du chromosome 7.

Par convention à un marqueur donné, le génotype de la lignée est noté A lorsqu'il est identique à celui du parent femelle (A17 dans les deux croisements), B lorsqu'il est identique à celui du parent mâle (DZA315.16 pour LR4 et F83005.5 pour LR5). H correspond au génotype hétérozygote. Les marqueurs flanquant les QTLs de résistance à *Va* V31-2 sont symbolisés par le cadre noir. Le LOD score (Logarithm of Odds) est utilisé pour estimer le degré d'association entre un le génotype à marqueur génétique et la résistance à *Va* V13-2. Interval correspond à la distance en cM entre deux marqueurs génétiques consécutifs, cumulated est la distance en cM séparant le premier marqueur du groupe de liaison du marqueur considéré.

LR5 : A17 [R] x F83005.5 [S]

Marqueurs	mtic226 chr7:19506076 - 19506204	MTE73 chr7:19917489 - 19917608	MTE85 chr7:25707895 - 25708075	MTE126 chr7:29064667 - 29064788	mtic719 chr7:31144656 - 31144775
Interval (cM)	8,8	10,9	7,8	3,9	2,1
Cumulated (cM)	42,6	51,4	62,3	70,1	74
LOD	18,1	16,3	21,8	31,8	35,9
RIL #					
2	B	B	H	-	B
39	B	H	B	B	B
79	A	H	H	B	B
100	H	A	H	A	H
142	H	H	H	A	A

LR4 : A17 [R] x DZA315.16 [S]

Marqueurs	mtic108 chr7:23424121 - 23424232	mtic273 chr7:23870434 - 23870549	MTE70 chr7:27826406 - 27826511	MTE126 chr7:29064667 - 29064788	mtic246 chr7:29503509 - 29503625
Interval (cM)	3,6	20,6	3,8	0,8	3,4
Cumulated (cM)	51,2	54,8	75,4	79,2	80
LOD	18,4	12,5	23,2	21,2	14,1
RIL #					
3	A	A	H	H	H
40	B	H	H	H	H
100	B	B	H	H	H

Tableau B-2 : Origines et phénotypes de maladie des 14 accessions choisies pour l'étude de l'expression de gène candidats à la résistance à *Verticillium alfalfae* V31-2

Numéro d'identification Hapmap	Nom de l'accension	Origine	Phénotype de maladie*
HM006	F83005-5	France	Sensible
HM025	TN9.22	Tunisie	Sensible
HM092	ESP174-A	Espagne	Résistant
HM101	A17	Inconnue	Résistant
HM114	CRE009-A	Grèce, Crète	Sensible
HM118	ESP043-B	Espagne	Résistant
HM128	F20058-6	France, Corse	Résistant
HM150	SA22323	Syrie	Sensible
HM165	DZA231-1	Algérie	Sensible
HM172	ESP048-E	Espagne	Résistant
HM176	ESP098-C	Espagne	Résistant
HM188	GRC040-1	Grèce	Sensible
HM192	SA07763	Tunisie	Sensible
HM201	SA24576	Maroc	Résistant

* Données phénotypiques obtenues au cours de ces travaux de thèse.

I. Matériel biologique

1. Matériel végétal

a. *Medicago truncatula*

Accessions naturelles

L'analyse de la biodiversité de la réponse à la verticilliose au sein de l'espèce *Medicago truncatula* a été réalisée chez 261 accessions naturelles (Annexe **Tableau F-2**, page 407) dont 246 accessions caractérisées dans le projet Hapmap (<http://www.medicagohapmap.org/hapmap/germplasm>) et 15 accessions tunisiennes. Parmi les lignées du projet Hapmap, les accessions de la Core Collection 192 proviennent du centre de ressources biologiques de *Medicago truncatula* de l'INRA de Montpellier (<http://www1.montpellier.inra.fr/BRC-MTR/mauguio/mauguio.php>). Les trois lignées Chateauneuf family 1 (HM246), Chateauneuf family 4 (HM247) et Lanautique family 3 (HM248) ont été fournies par le GREEN USDA. L'ensemble des autres accessions (incluant les lignées parentales des populations de lignées recombinantes RILs (Recombinant Inbred Lines), les lignées Damas et les lignées tunisiennes) sont des ressources disponibles dans notre laboratoire, développées en propre ou en collaboration avec le Centre de Biotechnologie de Borj Cedria (CBBC) en Tunisie. Les 261 accessions ont été multipliées dans nos serres.

Heterogenous Inbred Families

Huit RILs en génération F6 des populations LR4 (A17xDZA315.16) et LR5 (A17xF83005.5) montrant de l'hétérozygotie résiduelle ou recombinant au niveau du QTL majeur de résistance à *Verticillium alfalfae* V31-2 situé sur le chromosome 7 tel que décrit par Ben *et al.* (2013a, **Tableau B-1**) ont été multipliées dans nos serres afin de dériver des « Heterogeneous Inbred Families » (HIFs).

Accessions utilisées pour l'analyse fonctionnelle de gènes candidats

Les trois accessions utilisées pour les expériences de validation fonctionnelle par transformation génétique (i.e. A17 (résistant à *Va* V31-2), F83005.5 (sensible à *Va* V31-2) et SA03780 (très sensible à *Va* V31-2)) ainsi que les 14 accessions sélectionnées pour l'étude de l'expression de gènes candidats à la résistance à *Va* V31-2 ont été multipliées dans nos serres (**Tableau B-2**).

Mutants d'insertion *Tnt1*

Les lignées mutantes NF17607 et NF20967 (fond génétique : *M. tricycla* R108) proviennent de la banque de mutants d'insertion du rétrotransposon *Tnt1* de The Samuel Roberts Noble Foundation (<https://medicago-mutant.noble.org/mutant/>). Il s'agit de populations de mutants dans le gène Medtr7g070480, gène encodant une protéine de la famille des SEC14 et principal gène candidat de notre étude. Le rétrotransposon *Tnt1* (transposable element of *Nicotiana tabacum* cell type 1) d'une

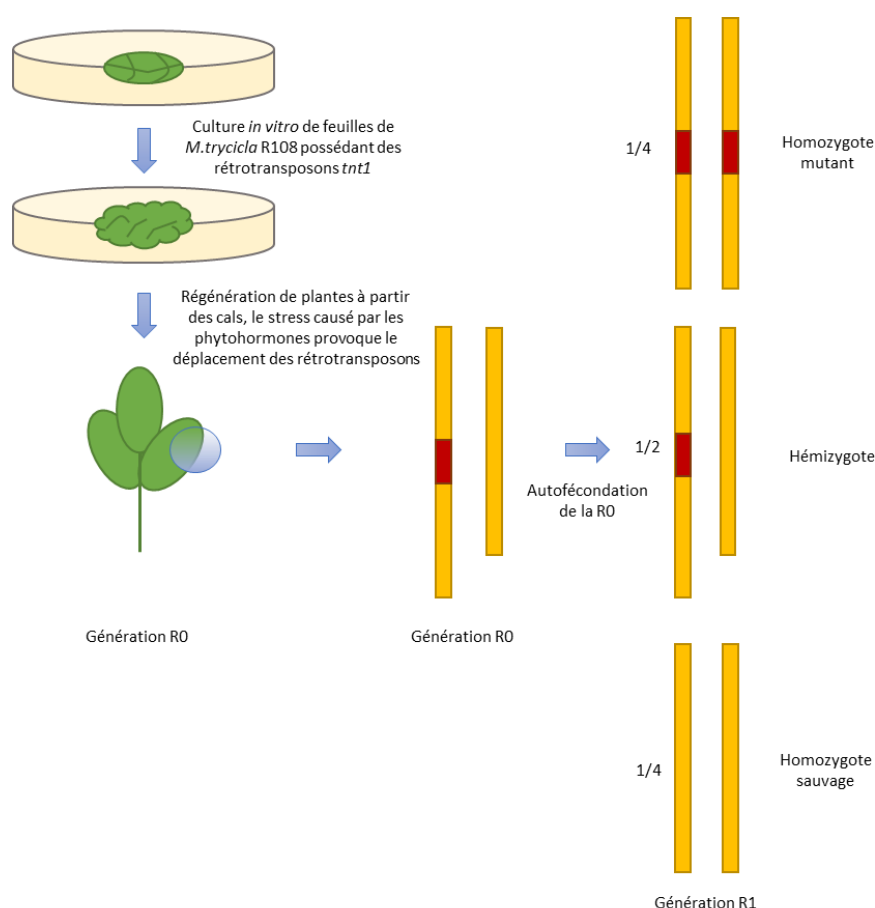


Figure B-1 : Mode d'obtention des mutants d'insertion *Tnt1*.

Des fragments de feuilles de *Medicago truncatula* R108 possédant cinq insertions *Tnt1* insérés par transformation génétique sont mis en culture *in vitro*. Le rétrotransposon a la capacité de se dupliquer et est mobile durant la régénération de plantes *in vitro* à cause du stress causé dû aux phytohormones. Dans la plante régénérée (R0), le rétrotransposon s'inactive. Toute la descendance des plantes R0 est hémizygote pour chaque insert. L'autofécondation des individus R0 permet d'obtenir en génération R1 ségrégant selon les lois de Mendel : pour un insert donné, $\frac{1}{4}$ des individus sont homozygotes mutants, $\frac{1}{2}$ des individus sont hémizygotes et $\frac{1}{4}$ des individus sont homozygotes sauvages.

Le rétrotransposon *Tnt1* est représenté en rouge, les barres jaunes symbolisent des fragments de chromosomes.

Tableau B-3 : Caractéristiques des lignées mutantes *Tnt1* de *Medicago truncatula* dans le gène *Medtr7g070480* codant pour une protéine SEC14.

#Lignées	Génération*	Nombre d'insertions (régions flanquantes à haute confiance)	Nombre d'insertions (régions flanquantes à basse confiance)	Insertion d'intérêt	Position de l'insertion d'intérêt dans le gène <i>Medtr7g070480</i>	Nombre de plantes autofécondées dans nos serres
NF17607	R1	32	34	NF17607_high_29	492 bp	7 dont une plante morte sans descendance
NF20967	R0	26	29	NF20967_high_15	259 bp	6

*R0 : plante hémizygote régénérée, R1 : descendant par autofécondation des plantes R0, génération constituée d'une population en ségrégation.

longueur de 5334 bp provient du tabac (*Nicotiana tabacum*). Le mode d'obtention de ces mutants d'insertion est présenté dans la **Figure B-1**.

La lignée NF17607 qui est en génération R1 correspond à une population en ségrégation : en théorie, un quart des individus sont homozygotes sauvages, un quart des individus sont homozygotes mutants et la moitié sont hémizygotes. La lignée NF20967 est en génération R0 et donc théoriquement 100% des individus sont hémizygotes. Sept plantes de la lignée NF17607 ont été autofécondées dans nos serres (dont une morte avant production de descendance) et six plantes pour NF20967.

Les accessions constituant la population Soliman (région se situant à 45 km au Sud-Est de Tunis, au bord du golfe de Tunis) ont été prélevées dans une plaine salée et font parties de différentes études sur l'adaptation au sel de populations tunisiennes de *Medicago truncatula* (**Figure B-2**, Friesen *et al.*, 2014; Vu *et al.*, 2015; Moriuchi *et al.*, 2016). Des gènes candidats à la tolérance à la salinité ou encore la plasticité transgénérationnelle en réponse au stress salin ont été étudiés en comparant des données génomiques et des phénotypes issus de populations prospectées en région saline (régions de Soliman et d'Enfidha) et non saline (régions d'El Kef et de Bulla Regia). Sur les 252 accessions originaires de la région de Soliman, 96 ont été sélectionnées en fonction de l'électro-conductivité des sols d'où elles sont originaires et ont été séquencées (48 accessions prélevées dans un sol aux faibles électro-conductivité (entre 0,66 et 3,48 dS/m) et 48 accessions issues de sols aux fortes électro-conductivités (3,58 et 17,01 dS/m), Wendy Vu, communication personnelle). Notre collaborateur Eric Von Wettberg nous a fourni quelques graines de ces accessions de *Medicago truncatula*, nous les avons multipliées en serre. Sur 96 accessions, 90 ont produit assez de graines et ont été utilisées pour une étude de génétique d'association pour la réponse à *Verticillium alfalfae* V31-2(Annexe **Tableau F-3**, page 415).

Mise en culture sur substrat ou *in vitro*

Pour germer, les graines de *Medicago truncatula* sont scarifiées en les frottant sur du papier de verre, puis placées dans des boîtes de Petri sur du papier absorbant imbibé d'eau. Elles sont ensuite placées à l'obscurité à 4°C pendant 2 à 4 jours, puis à 20°C pendant une nuit.

Les germinations sont ensuite transférées dans de petits pots de tourbe individuels (Jiffy-7®, référence 32170138-41mm) disposés sur des plateaux de dimension 45x36cm recouverts d'une fine couche de vermiculite humide (Agri Garonne, vermiculite moyenne référence : 867002). Les plateaux contenant les Jiffy-7® sont placés sous des mini-serres fermées pendant 2 jours puis progressivement ouverte afin de maintenir un micro-climat humide favorisant le développement de la jeune plantule dans un phytotron avec pour conditions 16 heures de jour à 25°C et 8 heures de nuit à 20°C.



Figure B-2 : Répartition géographique des 96 accessions de *Medicago truncatula* de la région de Soliman.

Le gradient de couleurs correspond à l'électro-conductivité du sol d'origine des accessions. Cette figure a été produite à partir de données GPS et d'électro-conductivité du sol d'origine pour chaque accession communiquées par Wendy Vu (USC, Los Angeles, USA).

Tableau B-4 : Composition du milieu Fahraeus.

Formule chimique	Poids moléculaire (g/mol)	Quantité de produit pour 100mL de solution stock (g)	Concentration de la solution stock (mM)		Volume à ajouter pour 1L de solution (µL)
Macro-éléments					
CaCl ₂ ·2H ₂ O	147,03	13,20	898	1000 X	1000
MgSO ₄ ·7H ₂ O	246,5	12	488	1000 X	1000
KH ₂ PO ₄	136,09	10	735	1000 X	1000
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	177,99	7,5	421	500 X	2000
Citrate d’ammonium ferrique	16,5 – 18,5% fer	0,5	0,5%	1000 X	1000
Micro-éléments					
MnCl ₂ 4H ₂ O	197,91	0,01	0,01	10000 X	100
CuSO ₄ ·5H ₂ O	249,69	0,01	4,01	10000 X	100
ZnCl ₂	136,28	0,01	7,34	10000 X	100
H ₃ BO ₄	61,84	0,01	16,17	10000 X	100
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	241,98	0,01	4,13	10000 X	100

La source d'azote de cette solution est ajoutée sous forme d'ammonium sulfate (NH₄2SO₄) à 0,33 g/L. Le pH de la solution est ajusté à 7,5 avant autoclavage.

Pour un milieu Fahraeus liquide, le chlorure de calcium (CaCl₂) est ajouté après autoclavage pour éviter toute précipitation.

Pour un milieu Fahraeus solide, 12 g/L de Bacto™ Agar (référence 214010) sont ajoutés.

Lorsque des extractions d'ARN racinaires sont prévues, les germinations sont disposées dans des alvéoles d'un volume de 27 mL contenant un mélange sable-perlite : 2/3 sable (sable pour filtration piscine, granulométrie de 0,5 à 2 mm, Castorama, référence : 297135) et 1/3 perlite. Les plantules sont ensuite arrosées avec 300 mL de solution Fahraeus (**Tableau B-4**) et placées sous mini-serres comme décrit précédemment.

Lors des essais de transformation génétique où les germinations devaient être stériles, une étape de désinfection des graines après la scarification est nécessaire. Cette étape consiste à plonger les graines dans un bain d'eau de Javel à 1,5% de chlore actif, puis à réaliser deux rinçages à l'eau stérile de 2 minutes puis un troisième d'une durée de 30 minutes. Les graines sont ensuite disposées dans des boîtes de Petri contenant du papier absorbant imbibé d'eau stérile. Les boîtes sont placées à 4°C pendant 6 jours puis à 14°C pendant 12 heures.

b. Systèmes végétaux hétérologues

Plusieurs systèmes végétaux hétérologues ont été évalués pour leur capacité à être infectés par *Verticillium* sp. afin d'être éventuellement utilisés lors des étapes de validation fonctionnelle des gènes candidats à la verticilliose.

Lotus japonicus

Les accessions naturelles de lotier (*Lotus japonicus* Gifu et MG-20, *Lotus krylovii*, *Lotus burttii*, *Lotus filicaulis*) et les mutants *LORE1* (LOtus REtrotransposon 1, lignées 30073834, 30005652 et 30106478, issues du fond génétique Gifu) proviennent du CARB (Centre for Carbohydrate Recognition and Signalling) de l'Université d'Aarhus au Danemark (<http://lotus.au.dk/>). Le rétrotransposon *LORE1*, d'une longueur de 5406 bp s'active dans les grains de pollens lors de la régénération *in vitro* de *Lotus japonicus* Gifu. La descendance de ces plantes (génération R1) est hémizygote au niveau des différents sites d'insertion de *LORE1*. Le rétrotransposon est parfois toujours actif chez les plantes R1, pouvant créer de nouvelles mutations en R2, mais est inactif chez les plantes de génération R2. En utilisant cette propriété, une collection de mutants a pu être établie par le CARB et l'Institut des Sciences Agrobiologiques de Tsukuba au Japon. On compte aujourd'hui plus de 140 000 lignées différentes (Fukai *et al.*, 2008, 2010, 2012; Małolepszy *et al.*, 2016). Les graines que nous avons reçues de trois mutants *LORE1* sont mutées dans le gène Lj1g2391210, orthologue de Medtr7g070480 codant pour une protéine SEC14. Ces graines sont des R3 (3^{ème} génération de plantes autofécondées après régénération des plantes *in vitro* R0) et constituent des lignées en ségrégation pour l'insertion du rétrotransposon *LORE1*. Seize plantes de la lignée 30073834, neuf de la lignée 30005652 et neuf de la lignée 30106478 ont été autofécondées dans nos phytotrons (**Tableau B-5**).

Tableau B-5 : Caractéristiques des lignées mutantes *LORE1* de *Lotus japonicus* dans le gène Lj1g2391210, orthologue du gène Medtr7g070480 codant pour une protéine SEC14.

#Lignées	Génération	Nombre d'insertions intragéniques	Nombre d'insertions intergéniques	Position de l'insertion d'intérêt dans le gène Lj1g2391210	Nombre de plantes autofécondées en phytotrons
30005652	R3	4	3	2117 bp	8
30073834	R3	2	1	2137 bp	16
30106478	R3	5	2	2137 bp	8

Tableau B-6 : Composition du milieu ¼ Broughton and Dilworth.

Nom de la solution	Formule chimique	Poids moléculaire (g/mol)	Quantité de produit pour 100mL de solution stock (g)	Concentration de la solution stock (M)		Volume à ajouter pour 1L de solution (µL)
A	CaCl ₂ ·2H ₂ O	147.03	29.4	2.0	2000 X	125
B	KH ₂ PO ₄	136.09	13.62	1.0	2000 X	125
C	Fe-Citrate	262.97	0.526	0.02	2000 X	125
D	MgSO ₄ ·7H ₂ O	246.5	12.34	0.5	2000 X	125
	K ₂ SO ₄	174.06	8.7	0.5	333 X	
	MnSO ₄ ·H ₂ O	169.02	0.338	0.002	2000 X	
	H ₃ BO ₄	61.84	0.248	0.004	2000 X	
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	287.56	0.288	0.001	2000 X	
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	249.69	0.01	0.004	20000 X	
	CoSO ₄ ·7H ₂ O	281.12	0.0052	0.0002	2000 X	
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	241.98	0.0048	0.0002	2000 X	

La source d'azote de cette solution est apportée sous forme de nitrate de potassium (KNO₃) à 0,10 g/L. Pour gélifier ce milieu, 14 g/L de Bacto™ Agar sont ajoutés.

Comme pour *Medicago truncatula*, les graines de *Lotus japonicus* sont scarifiées sur papier de verre, puis imbibées dans des microtubes de 1,5 mL contenant de l'eau à 4°C pendant 3 heures. Les graines sont ensuite transférées dans des boîtes de Petri sur du papier absorbant humide et placées à 4°C pendant 4 jours, puis 1 jour à 20°C. Les graines germées sont transférées en alvéole contenant un substrat constitué de 2/3 de terreau (Agri Garonne, terreau Prov rempotage P39, référence 8070002) et 1/3 de sable sous mini-serre dans un phytotron ayant pour une photopériode de 16 heures, à 25°C le jour et 20°C la nuit. Les mini-serres sont progressivement ouvertes pendant 5 jours avant d'être totalement retirées.

Des cultures *in vitro* des lignées Gifu et MG20 de *Lotus japonicus* ont été réalisées. Pour cela, après scarification, les graines de lotier ont été stérilisées dans un bain d'eau de Javel à 1% de chlore actif pendant 20 minutes puis rincées dans trois bains successifs d'une durée de 2 minutes. Les graines sont ensuite disposées sur des boîtes de Petri carrées de taille 12x12cm contenant du papier germination imbibé d'eau stérile (Anchor Paper Company, Hudson, WI, USA) puis mises en chambre froide à 4°C pendant 4 jours et 1 jour à 20°C. Les germinations sont ensuite disposées sur du papier germination dans des boîtes de Petri carrées (12x12 cm) contenant du milieu ¼ Broughton and Dilworth coulé de façon inclinée (**Tableau B-6**). Un cache est placé sur chacune des boîtes afin de maintenir les racines à l'obscurité, puis elles sont placées à la verticale en phytotron à 20°C avec une photopériode de 16 heures.

Arabidopsis thaliana et *Nicotiana* sp.

Les graines d'*Arabidopsis thaliana* (Col-0), *Nicotiana benthamiana* et *Nicotiana tabacum* (46-8) ont été obtenues auprès du Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales à Toulouse (LRSV, UMR 5546 CNRS/UPS). Les accessions Amarello, Basma Xanti, Line 49-10, Oxford 1, Samsoun, TI 448-A, Vesta 30 et Virginia Gold de *Nicotiana tabacum* proviennent de la collection de Nicotianées de l'Institut du Tabac de Bergerac (Seita - Groupe Impérial Tobacco). Ces accessions ont été choisies pour leurs niveaux de résistance à *Verticillium dahliae* décrits lors d'essais conduits dans des champs contaminés par plusieurs souches non identifiées de ce pathogène au milieu du XXème siècle (McLeod and Thomson, 1959; Wright, 1968): Amarello, Oxford 1, TI 448-A étaient résistantes, Vesta 30 et Virginia Gold étaient partiellement résistantes, Basma Xanti et Samsoun étaient sensibles. Les lignées 49-10 et 46-8 n'avaient pas encore été évaluées, mais compte tenu de la réponse différente des deux isolignées 49-10 et 46-8 inoculées par *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* race 0 et de la disponibilité de graines de la lignée 46-8, il nous a paru intéressant de tester la réponse à *Verticillium alfalfae* V31-2 chez ces deux lignées (Rancé *et al.*, 1998).

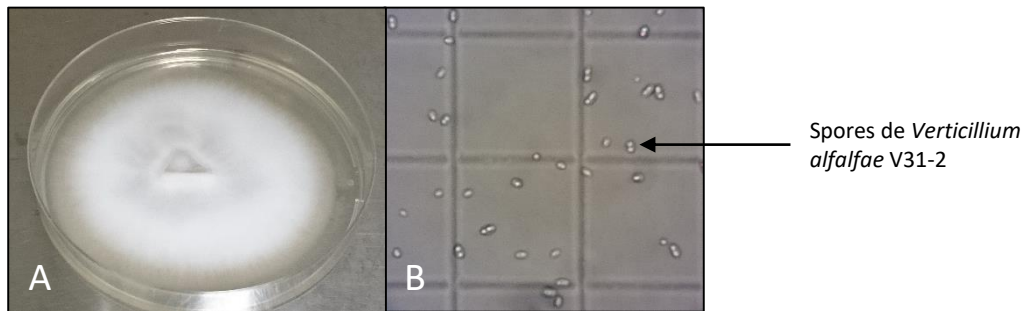


Figure B-3: *Verticillium alfalfae* V31-2.

A. Culture de V31-2 sur PDA âgée de 14 jours.

B. Spores de V31-2 sur cellule de Malassez (microscope optique, agrandissement x400).

Les semis d'*Arabidopsis thaliana* et *Nicotiana* sp. sont réalisés en prélevant 2 à 3 graines à l'aide d'un cône humide et en les déposant ensuite sur un Jiffy-7®. Les semis sont ensuite placés en phytotron avec une photopériode de 16 heures, à 25°C jour et 20°C nuit. Deux semaines après les semis, les plantules sont démarriées afin de n'en conserver qu'une par Jiffy-7®, elles sont ensuite laissées dans les mêmes conditions de culture pendant une à deux semaines supplémentaires afin d'atteindre le stade 7-8 feuilles pour *Arabidopsis thaliana* et 4-5 feuilles pour *Nicotiana* sp.

2. Espèce Pathogène

La souche V31-2 de *Verticillium alfalfae* a été isolée à partir de racines de luzerne (*Medicago sativa*) à Castanet-Tolosan et identifiée par J. Gondran (INRA, Lusignan, France) en 1977 (Molinéro-Demilly *et al.*, 2006). Quinze jours de culture sur 13 mL de milieu PDA (BD Difco™ Potato Dextrose Agar, référence : 213400) à 24°C et à l'obscurité sont nécessaires pour obtenir une quantité de spores suffisante pour l'inoculation de plantes (**Figure B-3**). La souche est conservée à -80°C sous forme d'une suspension de spores dans 25% de glycérol. La sporulation a lieu après quinze jours de culture sur milieu PDA, en immergeant dans de l'eau stérile le mycélium et en le frottant à l'aide d'un râteau.

3. Souches bactériennes

Trois souches différentes d'*Escherichia coli* ont été utilisées DH5α, TOP10, DB3.1 lors du clonage des gènes candidats à la résistance à *Verticillium alfalfae* V31-2 et des microARN artificiels. Les souches DH5α et TOP10 (Invitrogen™, Référence : C404003) sont des souches à haut rendement de transformation, qui permettent la répllication stable de plasmides et une extraction par miniprep d'ADN plasmidique de bonne qualité (Taylor, Walker, and McInnes, 1993). En plus des caractéristiques décrites précédemment, la souche DB3.1 peut croître en présence de ccdB, une protéine interférant avec les gyrases d'*E. coli* (Ogura and Hiraga, 1983). Cette souche permet de conserver les plasmides GATEWAY™ donneurs vides qui contiennent ce gène *ccdB* au niveau du site d'entrée de l'insert. Après recombinaison entre le plasmide donneur et le plasmide d'entrée, le gène *ccdB* est absent du plasmide donneur contenant l'insert, l'utilisation d'une souche d'*E. coli* sensible à la toxine ccdB comme DH5α, ou TOP10 combinée à l'antibiotique de sélection permet de sélectionner les clones ayant intégré le plasmide donneur contenant l'insert.

Toutes les souches d'*E. coli* sont multipliées à 37°C pendant 16 heures sur milieu LB liquide ou solide (respectivement BD Difco™ LB Broth, Miller (Luria-Bertani), référence 244620 et BD Difco™ LB Agar, Miller (Luria-Bertani) référence 244520).

B. MATERIEL ET METHODES

Pour la transformation génétique racinaire de *M. truncatula*, la souche ARqua1 d'*Agrobacterium rhizogenes* a été utilisée (Quandt, 1993). Elle a été multipliée sur milieu LB liquide ou solide à 28°C pendant 48 heures.

Toutes les souches bactériennes sont conservées à -80°C dans une suspension de LB liquide contenant 25% de glycérol.



Figure B-4 : Plantes de *Medicago truncatula* cultivées en pots Jiffy-7® inoculées par *Verticillium*.

Après 30 minutes dans une suspension de spores de *Verticillium alfalfae* V31-2 à 10^6 spores par mL ou dans de l'eau (condition contrôle), les plantes sont disposées sur une couche de terreau avant d'être placées en phytotron.

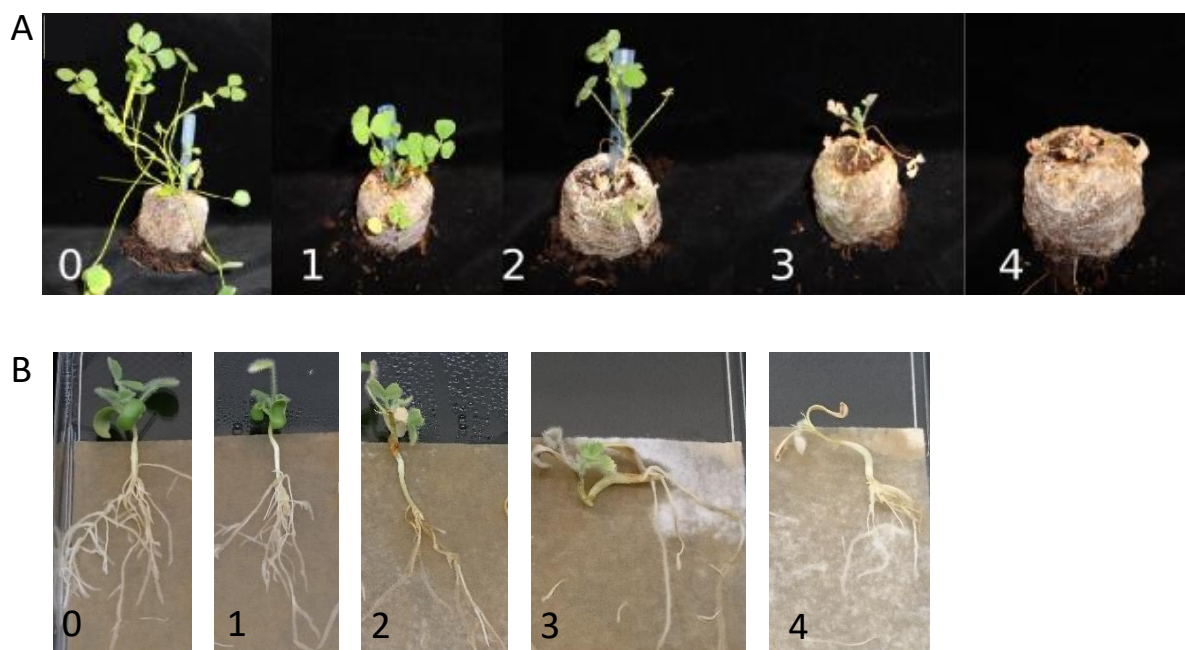


Figure B-5 : Echelle de développement des symptômes de la verticilliose chez *Medicago truncatula*.

Les scores de 0 à 4 correspondent à des stades caractéristiques du développement de la maladie.

A. pots Jiffy-7® (Ben *et al.*, 2013a) ou substrat sable/perlite.

B. culture *in vitro*.

Tableau B-7 : Composition du milieu MS utilisé pour la culture de racines transgéniques.

Produits	Quantité pour 1L de milieu
Murashige & Skoog Medium Including Vitamins	0,5 X soit 2,15 g
Saccharose	10,25 g
Bacto™ Agar	8 g

Le pH de ce milieu est ajusté à pH5,8 avant l'ajout de Bacto™ Agar.

II. Observations des phénotypes de maladie

1. Pathosystème *Medicago truncatula* / *Verticillium alfalfae*

a. Inoculation par *Verticillium alfalfae* et notation des symptômes

Inoculation sur plantes entières en culture en pots Jiffy-7® ou *in vitro*

Au stade première feuille trifoliée (soit 10 jours après transfert en pots Jiffy-7®), les plantes sont inoculées par une solution de spores à 10^6 spores/mL de *Verticillium alfalfae* V31-2. La suspension de spores est obtenue en grattant le mycélium préalablement recouvert d'eau stérile avec un râteau stérile. La pression du râteau sur le mycélium doit être suffisante afin de libérer les spores dans l'eau sans pour autant décoller le mycélium du champignon. La concentration de cette suspension est déterminée en utilisant une cellule de Malassez.

Avant d'être placées dans des plateaux de dimension 28,5x28,5 cm et contenant 800mL de suspension de spores à 10^6 spores/mL ou de l'eau pendant 30 minutes, les racines des plantes sont sectionnées sur 1cm afin de standardiser l'inoculation ; lorsque les plantes sont en Jiffy-7®, leur base est coupée, lorsqu'elles sont en alvéoles et que les racines ne sont pas visibles, les plantes sont déterrées et mises à tremper directement dans la solution de spores (cas des plantes chimériques). A l'issue de cette imbibition, du terreau est disposé au fond des plateaux (**Figure B-4**).

Les plantules aux racines transgéniques cultivées *in vitro* sont également inoculées au stade première feuille trifoliée (soit 21 jours après transformation). Les extrémités des racines des plantes sont coupées (0,5cm) et 100µL d'une suspension de spores de V31-2 à 10^6 spores/mL ou d'eau stérile sont déposés au niveau de la blessure.

Après inoculation, les plantes quel que soit leur système de culture, sont placées dans un phytotron à 20°C avec une photopériode de 16h. Le suivi des symptômes de maladie est ensuite réalisé plante à plante 2 à 3 fois par semaine pendant 4 semaines en utilisant une échelle croissante allant de 0 (plante saine) à 4 (plante morte) pour les plantes en Jiffy-7® et tous les deux jours pour les plantes en culture *in vitro* (**Figure B-5**)

Inoculation de racines transgéniques (ou 'hairy roots')

Un milieu Murashige & Skoog (MS, Duchefa Biochemie, référence M0222.0050, Annexe, **Tableau F-4** page 417) enrichi en saccharose est utilisé pour la culture de racines transgéniques (**Tableau B-7**). Trois jours avant inoculation des fragments de racine d'une longueur de 2 à 2,5 cm sont repiqués individuellement dans des boîtes de Petri contenant le milieu MS et mis à incubation à l'obscurité à 24°C.

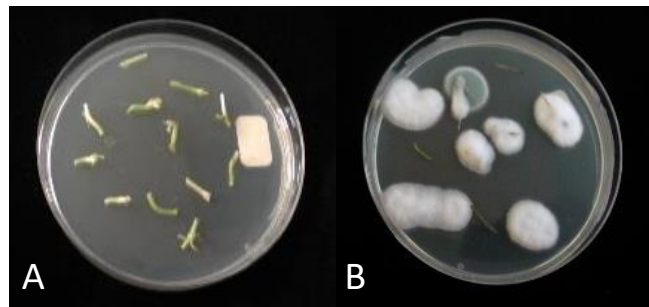


Figure B-6 : Tiges de *Medicago truncatula* à 5 jours après réisolement.

A. Lignée résistante.

B. Lignée faiblement partiellement résistante.

L'inoculation est réalisée en coupant de 0,3 à 0,6 cm des extrémités des fragments des racines puis en y déposant 10 µL d'une solution de spores à 10^3 spores/mL de *Verticillium alfalfae* V31-2 ou d'eau stérile. Les boîtes sont mises à incuber dans l'obscurité à 24°C (Mazaheri-Naeini *et al.*, 2015).

Pour caractériser la réponse à *Verticillium alfalfae* V31-2 des racines transgéniques, la proportion de racines colonisées par le champignon est calculée à sept jours après inoculation. Elle correspond au rapport de la longueur de racine colonisée sur la longueur totale des racines. Le second phénotype évalué correspond à l'accroissement racinaire en sept jours (longueur racinaire totale à 7 jours après inoculation – longueur racinaire totale le jour de l'inoculation).

Pour mesurer ces longueurs, les boîtes sont scannées le jour de l'inoculation et sept jours après inoculation. Afin d'obtenir des images sur fond noir, le scanner est utilisé le couvercle ouvert avec une résolution de 200 dpi et en mode niveau de gris. Les images sont ensuite traitées avec le module SmartRoot v4.21 (Lobet and Draye, 2013) implémenté dans ImageJ v1.50i (Schneider *et al.*, 2012).

b. Réisolement de *Verticillium alfalfae* à partir de fragment de tiges de *Medicago truncatula*

À l'issue du suivi des symptômes de flétrissement (soit 30 jours après inoculation), un fragment de tige de chaque plante est prélevé pour étudier la colonisation des parties aériennes des plantes par *Verticillium alfalfae* V31-2. Ces fragments d'une taille approximative de 2 cm lorsque c'est possible (pour certaines plantes mortes, un pétiole a dû être prélevé) sont rassemblés par génotype et désinfectés par un bain de 15 secondes d'éthanol à 70%, suivi par un bain d'eau de Javel à 0,96% de chlore actif pendant 6 minutes et de trois bains d'1 minute dans de l'eau stérile. Les fragments sont ensuite disposés dans des boîtes de Petri contenant du PDA et de la streptomycine à 100µg/mL. Les boîtes sont placées dans une étuve à 24°C pendant 5 jours (**Figure B-6**). Le taux de réisolement correspond au rapport du nombre d'extrémités où se développe *Verticillium alfalfae* V31-2 par le nombre total d'extrémités auquel on soustrait le nombre d'extrémités colonisées par des endophytes (bactéries ou champignons) soit :

$$\text{Taux de réisolement} = \frac{\text{Nombre d'extrémités colonisées par } Va \text{ V31} - 2}{\text{Nombre total d'extrémités} - \text{Nombre d'extrémités colonisées par des endophytes}}$$



Figure B-7 : Echelle de développement des symptômes de la verticilliose chez *Lotus japonicus*.

Les scores de 0 à 4 correspondent à des stades caractéristiques du développement de la maladie.

0 : la plante est saine, 1 : apparition des premiers symptômes (chlorose des feuilles), 2 : la tige principale est totalement chlorosée et partiellement nécrosée, 3 : la tige principale est nécrosée, les tiges secondaires ne présentent pas de symptômes, 4 : la plante est morte.

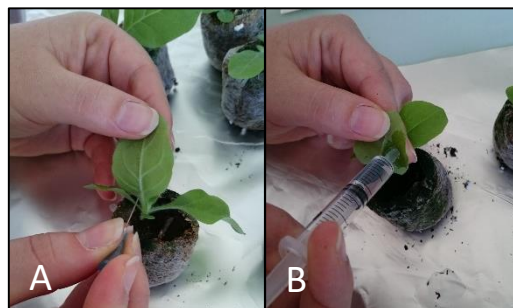


Figure B-8 : Inoculations foliaires de *Nicotiana benthamiana* par *Verticillium alfalfae* V31-2.

A. Inoculation à l'aiguille par piqûre.

B. Inoculation à la seringue par infiltration foliaire.

2. Autres modèles végétaux : *Lotus japonicus*, *Arabidopsis thaliana* et *Nicotiana benthamiana*.

Les inoculations des lotiers en Jiffy-7®, en alvéole et en culture *in vitro* sont réalisées de la même façon que pour *Medicago truncatula*. Ce pathosystème n'avait pas encore été décrit, il a été mis en place au sein de notre laboratoire. La notation des symptômes de maladie est réalisée 2 à 3 fois par semaine pour les plantes en Jiffy-7® et en alvéoles, tous les 2 jours pour les cultures *in vitro* en utilisant une échelle croissante de symptômes allant de 0 à 4 (**Figure B-7**).

Les pathosystèmes *Arabidopsis thaliana*/*Verticillium dahliae*, *Arabidopsis thaliana*/*Verticillium longisporum* et *Nicotiana tabacum*/*Verticillium dahliae* ont déjà été décrits (McLeod and Thomson, 1959; Wright, 1968; Veronese *et al.*, 2003; Johansson *et al.*, 2006). Dans le cadre de nos travaux, l'inoculation est réalisée sur des plantules d'*Arabidopsis thaliana* au stade 7-8 feuilles (soit 3 semaines), au stade 4-5 feuilles pour les plantules de *Nicotiana benthamiana* (soit 3 semaines) et *Nicotiana tabacum* (soit 4 semaines). Des inoculations racinaires et foliaires avec *V. alfalfae* ont été testées sur ces plantes. Pour l'inoculation racinaire, la base des Jiffy-7® est sectionnée, puis ils sont disposés dans des plateaux de dimension 18,5x18,5 cm contenant 400mL d'une solution de spores de V31-2 à 10⁶ spores/mL ou de l'eau pendant 30 minutes. Du terreau est ensuite ajouté au fond de ces plateaux.

Les inoculations foliaires ont été réalisées par piqûre ou par infiltration. Pour l'inoculation foliaire par piqûre, une aiguille creuse de seringue est trempée dans la suspension de spores puis 2 piqûres par feuille sont effectuées sur la nervure principale en face inférieure de 2 feuilles (**Figure B-8-A**). La suspension de spores est homogénéisée entre chaque piqûre avant d'y tremper l'aiguille. Les plantes sont ensuite placées sur des plateaux contenant du terreau. Pour l'inoculation foliaire par infiltration, la suspension de spores est prélevée à l'aide d'une seringue d'1mL. L'embout de la seringue est ensuite placé sur le limbe de la feuille en face inférieure, entre les principales nervures. Il faut exercer suffisamment de pression afin que la suspension de spores ne coule pas sur la feuille mais pénètre dans les tissus sans pour autant blesser la feuille. 100µL de suspension sont injectés dans deux feuilles par plante (**Figure B-8-B**). Comme précédemment, les plantes sont placées sur des plateaux contenant du terreau.

Après inoculation, les plantes sont placées dans un phytotron à 20°C avec une photopériode de 16h. Pendant 3 à 4 semaines, les symptômes des plantes sont notés 2 à 3 fois par semaine. La manifestation des symptômes suite à l'infection par *Va* V31-2 est différente selon les espèces. En ce qui concerne *Arabidopsis thaliana*, le nombre de feuilles présentant des chloroses est observé, il n'y a pas de flétrissement observable chez *Arabidopsis thaliana* (Häffner *et al.*, 2010). Chez *Nicotiana* sp., la proportion de feuilles présentant des chloroses et flétrissements est comptabilisée.

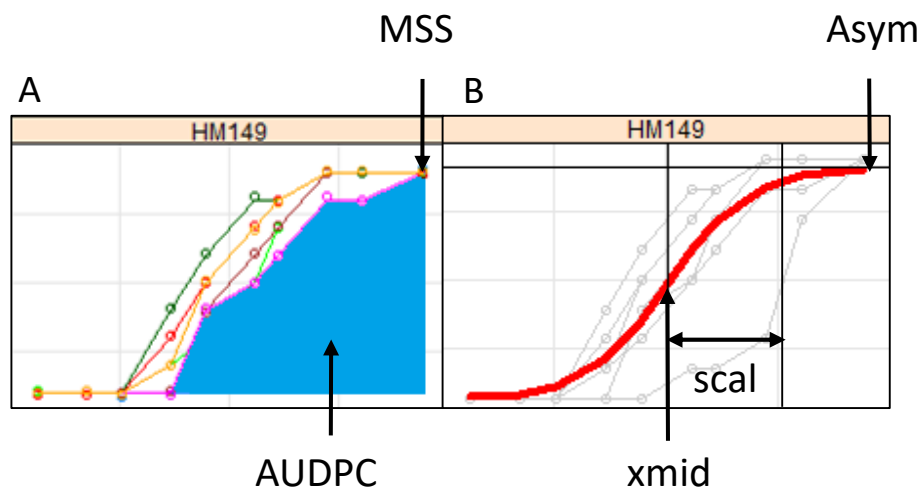


Figure B-9 : Illustration des phénotypes de maladie et des paramètres de modélisation pour une lignée.

A. Données brutes d'évolution de symptômes. Chaque courbe représente la progression de la maladie pour une plante. La surface bleue représente l'AUDPC (Area Under the Disease Progress Curve) d'une plante. Le MSS (Maximum Symptom Score) correspond au score de maladie au bout de quatre semaines.

B. Données modélisées selon un modèle mixte non linéaire implémentant une courbe logistique. En rouge, courbe de modélisation moyenne pour l'accèsion, en gris clair, données brutes d'évolution de symptôme de chaque plante. Asym: sévérité de la maladie en fin d'expérience, xmid : temps nécessaire pour atteindre 50% de Asym, scal : temps nécessaire pour passer de 50% à 75% de Asym.

III. Analyses statistiques et modélisation des données phénotypiques

1. Calcul de paramètres de maladie permettant la prise en compte de la cinétique d'évolution de symptômes

a. MSS

Le MSS (Maximum Symptom Score) correspond au score de maladie à la fin du suivi des symptômes. Cette durée varie entre 28 et 34 jours après inoculation. Le développement des symptômes après quatre semaines de suivi n'évoluant peu ou pas, aucune correction de données n'a été réalisée afin d'obtenir le MSS.

b. AUDPC

Le développement de la maladie est quantifié par l'AUDPC (Area Under the Disease Progress Curves, **Figure B-9**) qui est calculé pour chacune des plantes inoculées en utilisant le package agricolae (De Mendiburu, 2014) du logiciel R (The R Project for Statistical Computing, version 3.3.1). Les graphiques ont été tracés grâce aux packages lattice (Sarkar, 2008) et ggplot2 (Hadley, 2016).

c. Modélisation

Les cinétiques de développement des symptômes de maladie sont modélisées par une courbe logistique d'équation :

$$f(x) = \frac{Asym}{1 + e\left(-\frac{x - xmid}{scal}\right)}$$

avec x : temps en dpi (days post-inoculation), Asym: sévérité de la maladie en fin d'expérience, xmid : temps nécessaire pour atteindre 50% de Asym et scal : temps nécessaire pour passer de 50% à 75% de Asym (**Figure B-9**, Gilligan, 1990).

Ces courbes logistiques sont ajustées pour chaque plante en utilisant le package R nlme (Pinheiro *et al.*, 2012). Le modèle complet possède des effets fixes pour le génotype et des effets aléatoires par plantes nichées dans les génotypes pour chacun des paramètres. Le modèle le plus adapté a été choisi en utilisant le maximum de vraisemblance.

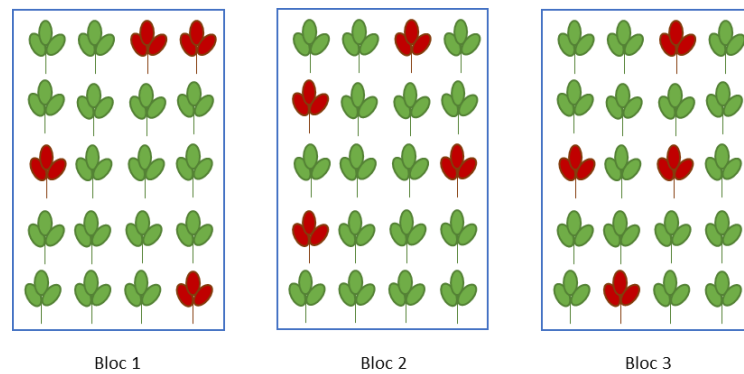


Figure B-10 : Représentation schématique d'un plan en bloc augmenté.

Chaque feuille trifoliée représente une accession. Les accessions rouges représentent les quatre lignées « Check » présentes dans les trois blocs. Dans nos essais, les accessions vertes sont toutes différentes les unes des autres dans les différents blocs. Les lignées « check » permettent de « corriger de l'effet bloc ».

2. Plans expérimentaux mis en place et modèles d'analyse statistique associés

a. Plan en blocs augmentés

Afin d'obtenir trois répétitions biologiques des phénotypes de maladie pour chacune des 261 accessions, treize expériences ont été nécessaires. Un plan d'expérience en bloc augmenté (**Figure B-10**) a été mis en place en incluant dans chacune de ces répétitions les accessions A17, F83005.5, DZA315.16 et DZA45.6 (accessions « check »), dont la résistance à *Va* V31-2 a déjà été étudiée au sein du laboratoire (Ben *et al.*, 2013a). Une partie de ces données a été acquise avant le début de cette thèse en collaboration avec l'entreprise R2n (M. C. Gras, M. C. Tardin) et par Cécile Ben accompagnée des étudiants stagiaires au sein d'EcoLab (Annexe **Tableau F-2** page 407). Les quatre lignées « Checks » permettent d'estimer l'effet bloc de chacune des répétitions et de corriger l'ensemble des données soit par la méthode des moyennes marginales (ou lsmeans, calculée en utilisant le package lsmeans (Lenth, 2016)), soit par la méthode des sommes des carrés de type I. Pour l'expérience CC192_RV2A, où les lignées « Checks » n'ont pas été incluses, l'effet bloc n'a pas pu être estimé, les données ont été traitées sans correction.

b. Plan factoriel complet

A l'exception de l'analyse de GWAS, l'ensemble des expériences a été effectué avec un plan factoriel complet avec plusieurs répétitions biologiques (considérées comme des blocs) avec absence d'interaction entre répétitions biologiques et génotypes.

c. Analyse de variance

Les analyses de variances (ANOVA), les tests de Shapiro (vérification du postulat de normalité des résidus), les tests de Levene (vérification du postulat d'homogénéité des variances) ont été réalisés avec le logiciel R. Les comparaisons multiples de moyennes ont été effectuées avec le test de Student-Newman-Keuls du package agricolae (De Mendiburu, 2014).

Les graphiques ont été tracés grâce aux packages lattice (Sarkar, 2008) et ggplot2 (Hadley, 2016) du logiciel R.

IV. Analyses de génétique quantitative et bio-informatique

1. Identification des gènes candidats à la résistance par génétique d'association

a. Modèles statistiques

Les études de génétique d'association ont été réalisées avec le logiciel TASSEL v5 (Bradbury *et al.*, 2007). Des modèles linéaires (GLM) et un modèle linéaire mixte (MLM) ont été utilisés lors des analyses de génétiques d'associations (Henderson, 1984).

Le modèle GLM utilisé le plus simple ne prend pas en compte l'effet de la structure de la population, contrairement au second qui a pour équation :

$$y = X\beta + Q + e$$

avec y : vecteurs d'observations, β : un vecteur inconnu de l'effet des allèles au SNP, X : matrice du dispositif, et Q : matrice représentant la structure de population en cofacteur fixe.

Le modèle MLM prenant en compte l'apparentement entre les individus et la structure de la population de *Medicago truncatula* est le suivant :

$$y = X\beta + Zu + e$$

avec y : vecteurs d'observations, β : un vecteur inconnu à estimer incluant l'effet des allèles au SNP, X et Z : matrices connues du dispositif et des effets génétiques respectivement. X contient également Q , la matrice de structure de population. u et e sont les effets aléatoires à estimer. u suit une loi normale de moyenne nulle et de variance σ^2_a (variance génétique additive) et e suit une loi normale de variance homogène σ^2_e (variance résiduelle). De plus :

$$\text{Var} \begin{pmatrix} u \\ e \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} G & 0 \\ 0 & R \end{pmatrix}$$

où $G = \sigma^2_a.K$ et $R = I.\sigma^2_e$ avec K , matrice de kinship (apparentement) entre les individus.

L'ensemble des calculs a été réalisé sur le cluster de la plateforme bio-informatique de calculs de Génotoul. Les meilleurs modèles ont été sélectionnés grâce à l'allure des diagrammes quantile-quantile (ou qqplots) représentant les P -values des SNPs observés en fonction des P -values des SNPs théoriques.

b. Données génétiques

Afin de limiter le nombre de faux positifs, les SNPs ont été filtrés en ne conservant qu'un alignement minimal de 150 accessions pour l'étude effectuée sur la biodiversité de *Medicago truncatula* et de 44 accessions pour l'étude de la population Soliman ainsi qu'une fréquence d'allèles minimales (MAF) à 5%. Ainsi, sur un total de 37 435 394 SNPs, 5 671 743 SNPs sont conservés pour l'étude au sein de la

collection *MtHapmap* et 232 661 sur 243 041 SNPs sont utilisés pour l'analyse de génétique d'association sur la population Soliman.

c. Structure de population

La structure de la population de l'espèce *Medicago truncatula*, en deux sous-populations (Ronfort *et al.*, 2006; Bonhomme *et al.*, 2013) a été déterminée sur un sous-ensemble de 40 000 SNPs par analyse en composante principale en utilisant le package *ade4* du logiciel R (Dray and Dufour, 2007).

Les accessions de la population Soliman ont été classées en fonction de l'électro-conductivité (EC) de leurs sols d'origine en deux groupes : les accessions dites sensibles au stress salin, prospectées sur un sol avec une EC inférieure à 3,5 dS/m (47) et les accessions tolérantes au stress salin avec un EC supérieure à 3,5 dS/m (43). Cinq accessions n'ont pas été classées car les données d'électro-conductivité étaient manquantes.

d. Matrices de Kinship

Les matrices de kinship ont été calculées avec le logiciel TASSEL v5. Dans le cas de l'étude conduite sur la biodiversité naturelle de *Medicago truncatula*, 40 000 SNPs ont été sélectionnés au hasard sur le génome afin de calculer cette matrice. En ce qui concerne la population tunisienne Soliman, l'ensemble des SNPs a été sélectionné.

2. Analyses de séquences et structure tertiaire protéique

Les alignements de séquences ont été réalisés en utilisant l'outil en ligne Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>, European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI)) et le logiciel BioEdit Sequence Alignment Editor, v7.2.5 (Hall, 2005).

Les arbres phylogénétiques ont été calculés en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance et testé par la méthode Bootstrap (Hasegawa and Kishino, 1994) implémenté dans le logiciel MEGA 6 v6.06 (Tamura *et al.*, 2013). Les arbres ont ensuite été représentés à l'aide du package R *ggtree* (Yu *et al.*, 2017a).

Le déséquilibre de liaison a été calculé avec le logiciel PLINK 1.9 (Purcell *et al.*, 2007) via la ligne de commande suivante :

```
plink --ped pic_sec14.ped --map pic_sec14.map --allow-no-sex --ld-window-kb 10 --ld-window-r2 0.7 -r2 --out pic_sec14
```


La recherche de gènes orthologues aux gènes candidats chez d'autres plantes modèles a été effectuée en ligne. Pour *Medicago sativa*, les protéines orthologues ont été identifiées sur la version V1.0 du génome de CALD (Cultivated Alfalfa at the Diploid Level) sur le site dédié à la luzerne (<https://www.alfalfatoolbox.org/doblast/>). Pour le lotier (*Lotus japonicus*), cette recherche a été effectuée à partir de la version V3.0 du génome de l'accèsion de référence MG-20 (<https://lotus.au.dk/blast/>). Chez *Arabidopsis thaliana*, la version TAIR10 du génome de l'accèsion de référence Col-0 (<https://www.arabidopsis.org/Blast/>) a été utilisée. Pour finir, les recherches de protéines orthologues chez *Nicotiana benthamiana* ont été effectuées sur la version V1.01 du génome, et chez *Nicotiana tabacum* sur la version V4.5 du génome de K326 sur le site dédié aux solanacées (<https://solgenomics.net/tools/blast/>)

Les modèles protéiques ont été prédits par l'outil en ligne Phyre² (Kelley *et al.*, 2015), <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>). Le logiciel Swiss-PdbViewer v4.1 a été utilisé afin de visualiser les prédictions issues de Phyre².

Tableau B-8 : Composition du tampon d'extraction d'ADN génomique.

Réactifs	Concentration mère	Quantité pour 100mL de tampon d'extraction
CTAB (Bromure de cétrimonium)	-	2 g
NaCl	5 M	28 mL
Tris-HCl	1 M pH8	10 mL
EDTA (Éthylène Diamine Tétra-Acétique)	0,5 M pH8	4 mL
H ₂ O	-	57,5 mL
Ajouter 0,5 mL de Béta-mercapto-ethanol juste avant extraction		

V. Biologie moléculaire

1. Méthodes de biologie moléculaire générale

a. Extraction d'ADN génomique

Des extractions d'ADN génomique de *Medicago truncatula* ont été réalisées afin de génotyper les mutants *Tnt1*, les lignées de RILs et pour quantifier l'ADN de *Va* V31-2 présent dans les parties aériennes de *Medicago truncatula* après inoculation. Les extractions d'ADN de *Lotus japonicus* ont été faites afin de génotyper les mutants *LORE1*.

Trois jeunes feuilles ou des fragments de tiges de plantes sont prélevés et mis à sécher 48h à 65°C dans des microtubes de 2 mL contenant 3 à 5 billes de verres. Les échantillons sont réduits en poudre à l'aide d'un broyeur mécanique (Retsch MM300) à 30 pulses par seconde pendant 2x45 secondes. Par mesure de sécurité, les étapes suivantes sont réalisées sous une hotte.

L'extraction au CTAB (Murray and Thompson, 1980) débute par une lyse cellulaire avec l'ajout d'1 mL de tampon d'extraction (**Tableau B-8**) dans chaque échantillon puis leur incubation à 65°C pendant 20 minutes. 600 µL de chloroforme sont ajoutés et les échantillons sont mélangés vigoureusement pendant 15 minutes à température ambiante. Les échantillons sont centrifugés pendant 10 minutes à 12000 g. Le surnageant est prélevé et transféré dans de nouveaux microtubes de 1,5 mL.

Pour précipiter les acides nucléiques, 600 µL d'isopropanol sont ajoutés dans chaque tube, les solutions sont homogénéisées en retournant les tubes 3 fois. Les échantillons sont centrifugés 1 minute à 12000 g.

Le surnageant est éliminé, le culot est lavé avec 500 µL d'éthanol à 70% et centrifugé 10 minutes à 12000 g. Le surnageant est jeté, et les échantillons sont séchés 10 minutes sous la hotte. Le culot est ressuspendu dans 30 µL d'eau UHQ.

b. Quantification de l'expression des gènes et des amiRs par qRT-PCR

Extraction d'ARN

L'expression racinaire du gène candidat Medtr7g070480 à la résistance à la verticilliose a été étudiée chez 14 lignées de *Medicago truncatula* à 0 et 1 jour après inoculation par *Va* V31-2, en condition contrôle et inoculée ; trois répétitions biologiques indépendantes ont été réalisées. En ce qui concerne son expression racinaire chez les plantes chimériques et chez les racines transgéniques, elle a été étudiée avant inoculation par *Verticillium alfalfae* afin de vérifier l'efficacité des transformations génétiques.

Quel que soit l'origine des échantillons, ils ont été récoltés et emballés dans du papier aluminium refroidis à l'azote liquide afin d'éviter toute dégradation des ARN avant d'être stockés à -80°C. Ils sont ensuite broyés dans l'azote liquide au pilon dans des mortiers préalablement refroidis dans de l'azote liquide et stockés à -80°C sous forme de poudre dans des tubes de 15 mL.

L'extraction d'ARN est réalisée au TRIzol® Reagent (Invitrogen™, référence 15596026), sous hotte et dans la glace. L'ensemble des réactifs utilisés est conservé au réfrigérateur. 1 mL de TRIzol® est ajouté pour 250 mg de tissu broyé, les échantillons sont vortexés 15 secondes afin de les homogénéiser. Puis ils sont incubés 15 minutes à 37°C pour dissoudre les complexes nucléoprotéiques.

200 µL de chloroforme pour 250 mg de tissu sont ajoutés à chaque échantillon, ils sont homogénéisés au vortex 15 secondes, puis centrifugés 15 minutes à 12000 g à 4°C. Le surnageant est transféré dans de nouveaux microtubes de 1,5 mL préalablement refroidis dans la glace.

500 µL d'isopropanol pour 250 mg de tissu sont ajoutés, les tubes sont homogénéisés par retournement et laissés à incuber 15 minutes dans de la glace. Les échantillons sont ensuite centrifugés 20 minutes à 8000 g à 4°C puis le surnageant est éliminé.

Afin de purifier les ARN (les racines sont riches en polysaccharides), le culot est resuspendu dans 100µL dans une solution de chlorure de lithium à 2,5 M (solution mère constituée de LiCl₂ à 7,5 M et d'EDTA à 50 mM, pH 8). Les échantillons sont ensuite laissés une nuit à 4°C, puis centrifugés 20 minutes à 12000 g à 4°C. Le surnageant est éliminé. Cette étape de purification n'a pas été réalisée pour les échantillons destinés à l'étude d'expression des amiRs puisque le chlorure de lithium ne précipite pas les ARN d'une taille inférieure à 300 nucléotides.

L'étape finale de l'extraction correspond à une étape de lavage en ajoutant 1 mL d'éthanol à 70% aux échantillons et en centrifugeant 10 minutes à 8000 g à 4°C. L'éthanol est éliminé puis les culots sont séchés 20 minutes avant d'être resuspendus dans 30 µL d'eau DEPC (diethyl pyrocarbonate).

Les ARN sont conservés à -80°C.

Tableau B-9 : Mélange réactionnel pour le traitement d'1µg d'ARN à la DNase.

(RQ1 RNase-Free DNase, Promega, référence M6101).

Produits	Concentration mère	Volume (µL)
RQ1 DNase Reaction Buffer	10 X	1
RQ1 RNase-Free DNase	0,35 µM	1
ARN	-	8

Tableau B-10 : Mélange réactionnel pour la synthèse d'ADN complémentaire pour un échantillon.

(kit ImProm-II™ ReverseTranscription System, Promega, référence A3800).

Produits	Concentration mère	Volume (µL)
ARN + amorce Oligo(dT) ₁₅	-	12
ImProm-II™ Reaction Buffer	5 X	4
MgCl ₂	25 mM	1,2
dNTP Mix	10 mM	1
Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor	-	0,5
ImProm-II™ Reverse Transcriptase	-	1
H ₂ O DEPC	-	0,3

Tableau B-11 : Mélange réactionnel pour la qPCR et RT-qPCR pour un échantillon.

Produits	Concentration mère	Volume (µL)
KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix	2 X	5
Amorces sens et anti-sens	0,35 µM	2
ADNg ou ADNc	*	3

* la quantité totale d'ADN utilisé pour une réaction dépend du gène quantifié : 10ng pour la quantification de gènes de *Medicago truncatula*, 50ng pour les gènes de *Verticillium alfalfae* V31-2.

Tableau B-12 : Amorces utilisées lors des qPCR et RT-qPCR.

Gènes (v4.0)	Annotations (v4.0)	Désignations	Séquences sens des amorces 5' -> 3'	Séquences anti-sens des amorces 5' -> 3'
Medtr2g008050 ^a	actin-related protein 4A	Actine	TGGCATCACTCAGTACCTTTCAACAC	ACCCAAAGCATCAAATAATAAGTCAA
Medtr3g085850 ^b	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3DPH	TGCCTACCGTCGATGTTTCAGT	TTGCCCTCTGATTCTCTCTTG
Medtr4g097170 ^b	core histone H2A/H2B/H3/H4	H3L	ATTCCAAAGGCGGCTGCATA	CTTTGCTTGGTGCTGTTTAGATGG
Medtr7g070440	F-box protein interaction domain protein	F-box	ACGGGTGGTTTGTGTTGATTGC	ACAAGAGGGACCCCATGACC
Medtr7g070480	SEC14 cytosolic factor family protein	SEC14	CAGAATGGTCCCCAAACTAGC	TCCAAATCCCAGCCTCCAAC
Medtr2g099470	chitinase (Class IV) / Hevein	PR4	GGTGATGCATATTGTGGCACAGGG	GCAGCAGCAACCTCACGTTTGGAG
Medtr1g062590 ^c	allergen Pru protein, putative	PR5	TGCCTTAGCTTGCATTCTCT	AATTTCCGCTGAGTTCGTTG
Medtr1g064090 ^c	phenylalanine ammonia-lyase-like protein	PAL	GAATTGCTTCCCATGATAGTGGTGTTAG	GGCATTCAAAAACCTAATTAGCTCC

^a(Ariel *et al.*, 2010) ; ^b(Ben *et al.*, 2013b) ; ^c(Gao *et al.*, 2007)

Traitement à la DNase

Avant de procéder à la réaction de reverse transcription, les ARN extraits sont traités à la DNase (RQ1 RNase-Free DNase, Promega, référence M6101). Le mélange réactionnel utilisé pour le traitement d'1 µg d'ARN est présenté dans le **Tableau B-9**. Les échantillons sont incubés 30 minutes à 37°C, 1 µL de Stop Solution (20 mM EDTA à pH 8.0) est ajouté puis ils sont incubés 10 minutes à 65°C afin de dénaturer la DNase).

Analyse de l'expression des gènes candidats dans les racines de *Medicago truncatula*

Le kit ImProm-II™ ReverseTranscription System (Promega, référence A3800) a été choisi pour réaliser la réaction de transcription reverse avant la quantification du gène candidat Medtr7g070480 à la résistance à *Va* V31-2 chez *Medicago truncatula*. Les 12 µL d'ARN traités à la DNase sont mélangés avec 1 µL d'Oligo(dT)₁₅, mis à incuber 5 minutes à 70°C puis au moins 5 minutes dans la glace. 8 µL du mélange réactionnel présenté dans le **Tableau B-10** sont ensuite ajoutés à chaque échantillon. La synthèse des ADN complémentaires (ADNc) est ensuite réalisée en incubant les échantillons à 25°C pendant 5 minutes, à 42°C pendant 60 minutes puis à 70°C pendant 15 minutes.

Les ADNc sont conservés à -20°C.

Les réactions de qPCR ont été effectuées dans l'ABI PRISM® 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). Le KAPA SYBR® FAST qPCR Kit (Kapa Biosystems, référence KK4605) est utilisé avec 10ng d'ADNc par réaction (**Tableau B-11**). Tous les échantillons ont fait l'objet de deux répétitions techniques. Trois gènes normalisateurs ont été utilisés : Medtr2g008050 (Actine), Medtr3g085850 (G3DPH) et Medtr4g097170 (H3L). En plus de l'expression du gène candidat Medtr7g070480 (SEC14), l'expression de gènes de réponses aux stress biotiques a été étudiée. Il s'agit des gènes Medtr2g099470 (PR4 ; induit par la voie de l'acide jasmonique), Medtr1g062590 et Medtr1g064090 (respectivement PR5 et PAL ; induits par la voie de l'acide salicylique (Gao *et al.*, 2007)). L'étude de l'expression de ces gènes en réponse à l'inoculation par *Verticillium alfalfae* V31-2 couplée au suivi des symptômes de flétrissement des plantes non récoltées permet de vérifier l'efficacité de l'inoculation. Les amorces utilisées lors de ces qRT-PCR sont présentées dans le **Tableau B-12**. Le programme qPCR est présenté dans le **Tableau B-13**.

La variation d'expression des gènes candidats à la résistance à *Verticillium alfalfae* V31-2 et des gènes de réponses aux stress biotiques est estimée par le $2^{-\Delta\Delta Ct}$ où $\Delta\Delta Ct = (Ct_{cible} - Ct_{standard})_{inoculée} - (Ct_{cible} - Ct_{standard})_{contrôle}$. Le $Ct_{standard}$ correspond à la moyenne harmonique des Ct des trois gènes normalisateurs (Livak and Schmittgen, 2001).

Tableau B-13 : Programme qPCR et RT-qPCR.

Nombre de cycles	Température	Temps
1 cycle	50°C	2 min
1 cycle	95°C	10 min
40 cycles	95°C	15 sec
	60°C	1 min
1 cycle	95°C	15 sec
	60°C	15 sec
	95°C	15 sec

Tableau B-14 : Mélange réactionnel pour la ligation des adaptateurs aux miRs matures pour un échantillon.

(miScript® Plant RT kit, Quiagen, référence 218760).

Produits	Concentration mère	Volume (µL)
miScript® ligation buffer	10 X	2
miScript® Plant Adaptor	10 X	2
miScript® Plant RNA Ligase	-	1
ARN	50 ng/µL	5
miScript® Ligation Activator	2 X	10

Tableau B-15 : Mélange réactionnel pour la synthèse des ADNc des miRs matures pour un échantillon.

(miScript® Plant RT kit, Quiagen, référence 218760).

Produits	Concentration mère	Volume (µL)
miScript® Plant RT Buffer	5 X	4
miScript® Plant RT Nucleics	10 X	2
H ₂ O DEPC	-	9
miScript® Plant Reverse Transcriptase	-	1
Produit de ligation	12,5 ng/µL	4

Tableau B-16 : Mélange réactionnel pour la RT-qPCR des miRs matures pour un échantillon.

(QuantiTect® SYBR® Green PCR Kit (Quiagen, référence 204141).

Produits	Concentration mère	Volume (µL)
QuantiTect® SYBR® Green PCR Master Mix	2 X	5
Amorce miScript® Universal	0,5 µM	1
Amorce miR cible	0,5 µM	1
miADNc	1 ng/µL	3

Tableau B-17 : Programme RT-qPCR des miRs matures.

Nombre de cycles	Température	Temps
1 cycle	95°C	15 min
40 cycles	94°C	15 sec
	55°C	30 sec
	70°C	30 sec
1 cycle	95°C	15 sec
	60°C	15 sec
	95°C	15 sec

Expression des amiRs dans les racines transgéniques de *Medicago truncatula*

Pour transcrire les amiRs, le kit miScript® Plant RT Kit a été utilisé (Quiagen, référence 218760). Pour cette application, 5µL contenant 250 ng d'ARN sont utilisés. Deux étapes sont nécessaires à la synthèse des ADNc. La première étape permet la ligation d'un adaptateur sur les miRs matures, le mélange réactionnel est présenté dans le **Tableau B-14**. Le mélange est ensuite incubé 1 heure à 16°C, puis 20 minutes à 65°C et est maintenu à 4°C. Le produit de ligation est mis à température ambiante pendant 2 minutes, puis 4 µL sont prélevés et ajoutés au mélange réactionnel présenté dans le **Tableau B-15**. Le mélange est incubé 2 heures à 37°C, puis 5 minutes à 95°C. Les miADNc sont conservés à -20°C.

Les réactions de qPCR ont été effectuées dans l'ABI PRISM® 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). Le QuantiTect® SYBR® Green PCR Kit (Quiagen, référence 204141) est utilisé avec 3ng de miADNc par réaction. La composition du mélange réactionnel est présentée dans le **Tableau B-16** et le programme qPCR dans le **Tableau B-17**. snU6 (petit ARN non codant U6 impliqué dans la maturation des ARN (Waibel and Filipowicz, 1990)) est utilisé comme normalisateur (Lelandais-Briere et al., 2009). Les amorces spécifiques des amiRs correspondent à leurs séquences, toutes les amorces sont présentées dans le **Tableau B-18**. Tous les échantillons ont fait l'objet de deux répétitions techniques.

Les résultats obtenus sont analysés avec le logiciel SDS 2.3 (Applied Biosystems). Les courbes d'amplifications des échantillons exprimant l'amiR sont comparées à celle du témoin (échantillons transformés avec un vecteur vide) : une amplification doit être identifiée chez les échantillons de plantes transformées exprimant l'amiR, aucune amplification ne doit être visible chez les échantillons de plantes transformées avec le vecteur vide.

Tableau B-18 : Amorces utilisées pour la RT-qPCR sur les miRs matures.

Noms	Séquences sens des amorces 5' -> 3'
snU6	TGGCCCTGCGCAAGGATGA
amiR_Fbox	TCTTAGCTCGACAATGACCGT
amiR_SEC14	TAGACGCAGAGTTATTGGCCG

Tableau B-19 : Mélange réactionnel pour la PCR standard pour un échantillon.

Produits	Concentration mère	Volume (µL)
ADN	*	2
Tampon PCR	10 x	2,5
MgCl ₂	50 mM	1,25
dNTPs	1,25 mM	4
Amorce sens	5 µM	2
Amorce anti-sens	5 µM	2
Taq polymérase	35 U/µL	0,25
H ₂ O	-	11

*La concentration en ADN varie en fonction de son origine : 0,5 ng/µL pour l'ADN plasmidique d'*E.coli*, 5 ng/µL pour l'ADN plasmidique d'*A.rhizogenes*, 50 ng/µL pour l'ADN génomique de plante.

Tableau B-20 : Programme PCR standard.

Etapes	Nombre de cycles	Température	Temps
Dénaturation préliminaire	1 cycle	94°C	2 min
Dénaturation	38 cycles	94°C	30 sec
Hybridation		*	30 sec
Elongation		72°C	30 sec/kb
Elongation finale	1 cycle	72°C	1 min 30 sec

*cf. Tableau B-25 pour obtenir la température d'hybridation.

Tableau B-21 : Mélange réactionnel pour purification de produits PCR pour un échantillon.

Produits	Concentration mère	Volume (µL)
Produit PCR	-	5
FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase	1 U/µL	1
Exonucléase I	20 U/µL	0,5
Tampon FastSAP	10 X	0,5

c. Réactions PCR et séquençage Sanger

Des PCR avec une Taq polymérase standard suivies du séquençage du produit PCR ont été réalisées afin de sélectionner les bonnes colonies de bactéries lors des différentes étapes de clonage de l'amiR et de l'ADNc dans le plasmide d'expression, mais aussi afin de séquencer l'ADNc du gène candidat Medtr7g070480 chez 14 lignées de *Medicago truncatula*. Des PCR sans séquençage ont été effectuées afin de génotyper les mutants *Tnt1* de *Medicago truncatula* et les mutants *LORE1* de *Lotus japonicus*.

Les mélanges réactionnels et les programmes PCR utilisés sont présentés **Tableau B-19** et **Tableau B-20**.

Après confirmation de la taille des produits PCR suite à leur migration sur gel d'agarose 2%, 5µL de produits PCR sont purifiés en utilisant un mélange réactionnel composé de FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Thermo Scientific, référence EF0654) et d'exonucléase I (New England BioLabs, référence M0293S) (**Tableau B-21**). Le mélange est incubé à 37°C pendant 15 minutes puis inactivé 15 minutes à 85°C. Ce protocole permet d'éliminer les amorces et de dégrader les nucléotides non incorporés.

Une partie du séquençage a été réalisée par la société GATC Biotech, un mélange de 5µL de produit PCR purifié à 80ng/µL et de 5µL d'amorce à 5µM leur a été envoyé. La réaction de séquençage Sanger a également été réalisée au laboratoire en utilisant le BigDye® Terminator v3.1 kit (Applied Biosystems, référence 4337455). Le mélange réactionnel et le programme de réaction de séquence sont présentés dans le **Tableau B-22** et le **Tableau B-23**. Ce mélange contient des désoxynucléotides trisphosphates (dNTPs) ainsi que des didésoxynucléotides trisphosphates (ddNTPs). Ces ddNTPs possèdent un marqueur fluorescent (une couleur par ddNTPs) et lorsqu'ils sont incorporés dans le produit PCR, ils stoppent son élongation.

A l'issue de la réaction de séquençage Sanger, le milieu réactionnel contient donc un mélange de produits PCR de tailles différentes. Les réactions de séquençage sont ensuite transmises à la plateforme Génomique de Toulouse qui se charge de les purifier sur résine Sephadex® G50 super fine afin d'éliminer l'excès d'amorce et les nucléotides non incorporés.

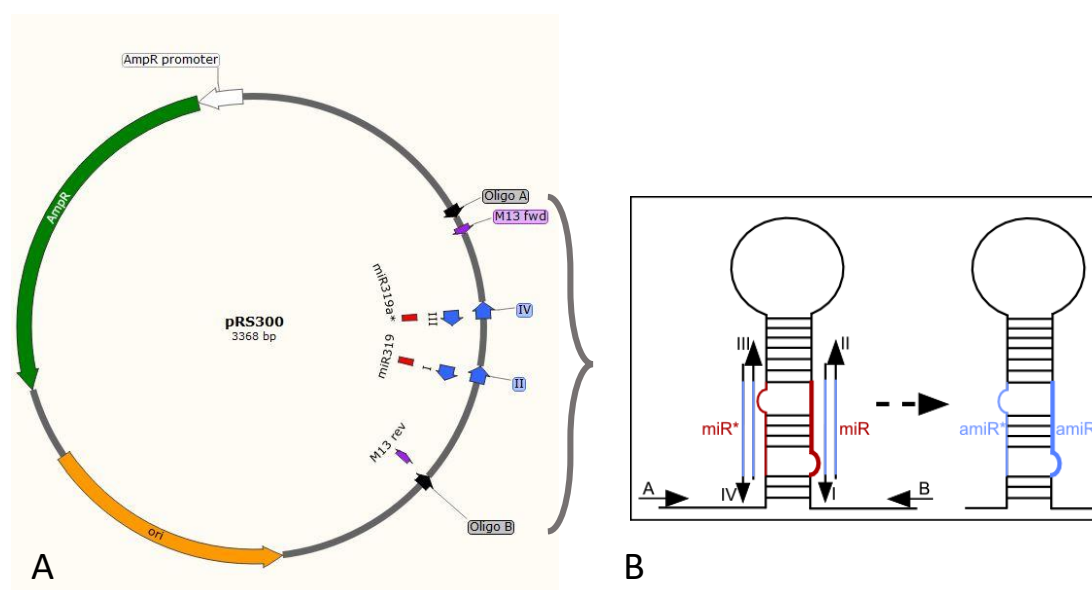
L'électrophorèse capillaire est ensuite réalisée avec le séquenceur ABI PRISM® 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems). Elle permet de séparer les produits PCR par taille, détecte la couleur de fluorescence du ddNTP se trouvant à l'extrémité du produit PCR, ce qui permet de déterminer la séquence du produit PCR initial. Les résultats obtenus sont analysés avec le logiciel Sequence Scanner v1.0 (Applied Biosystems).

Tableau B-22 : Mélange réactionnel pour la réaction de séquence pour un échantillon.

Produits	Concentration mère	Volume (µL)
Produit PCR purifié	80 ng/µL-	2
BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	2,5 X	1
BigDye® Terminator v3.1 Sequencing buffer	5 X	3,5
Amorce	4 µM	1
H ₂ O	-	12,5

Tableau B-23 : Programme de réaction de séquence Sanger.

Etapes	Nombre de cycles	Température	Temps
Dénaturation préliminaire	1 cycle	95°C	5 min
Dénaturation	38 cycles	96°C	30 sec
Hybridation		55°C	15 sec
Elongation		60°C	4 min

**Figure B-11: Principe de synthèse des amiRs.**

A. Carte du plasmide pRS300 contenant le précurseur du miR319a d'*Arabidopsis thaliana* (Schwab, 2005).
 B. Visualisation de la position des amorces nécessaires à la synthèse de l'amiR. En rouge, la séquence spécifique du miR319a, les flèches bleues représentent les amorces et en bleu la séquence de l'amiR (Schwab, 2005).

Tableau B-24 : PCR successives nécessaires à l'obtention des amiRs (extrait de Schwab, 2005).

	Amorce sens	Amorce anti-sens	Matrice
(a)	oligo A	IV	pRS300
(b)	III	II	pRS300
(c)	I	oligo B	pRS300
(d)	oligo A-topo	oligo B	(a)+(b)+(c)

2. Clonage des microARNs artificiels (amiRs) et des gènes candidats

a. Recherche des amiRs, choix des amorces et obtention des inserts

Recherche des amiRs et choix des amorces

Les séquences des amiRs ciblant les gènes candidats ont été générées en utilisant l'outil en ligne WMD3-Web MicroRNA Designer (<http://wmd3.weigelworld.org>). A partir de l'ADN complémentaire du gène cible, cet outil génère une liste d'amiRs potentiels suivant des critères d'efficacité (une séquence de 21 nucléotides, un U en position 1, un A en position 10, et une instabilité de la région 5') et de spécificité (Ossowski *et al.*, 2008). La dernière version V4.0 du génome de *Medicago truncatula* n'étant pas implémentée dans WMD3 (le logiciel utilise la version V3.5 du génome), la spécificité des amiRs a été vérifiée sur cette version du génome grâce à l'outil en ligne psRNATarget (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>, (Dai and Zhao, 2011)). Les amiRs ciblant les ARNm des gènes Medtr7g070440 (F-box protein interaction domain protein) et Medtr7g070480 (SEC14 cytosolic factor family protein) ont respectivement pour séquence UCUUAGCUCGACAAUGACCGU et UAGACGCAGAGUUAUUGGCCG.

Le clonage de l'amiR s'effectue par mutagénèse dirigée du précurseur du miR319a d'*Arabidopsis thaliana* contenu dans le plasmide pRS300 grâce à des PCR successives chevauchantes (**Figure B-11** et **Tableau B-24**). L'outil oligo de WMD3 permet d'obtenir les séquences des amorces à utiliser en fonction de la séquence de l'amiR et du vecteur utilisé pour le clonage (**Tableau B-25**). Un protocole en ligne pour synthétiser l'amiR est également disponible sur ce site (Schwab, 2005).

Choix des amorces pour le clonage des ADNc

Pour cloner les ADNc complets des gènes candidats, des amorces ont été choisies afin d'être spécifiques et de présenter une température de fusion théorique de 55°C grâce à l'outil en ligne Primer-Blast (Ye *et al.*, 2012). Cette température a été sélectionnée afin d'obtenir des produits PCR spécifiques, la diminution de la température de fusion provoque l'apparition des produits aspécifiques lors des PCR par mésappariement entre amorces et ADN. Primer-Blast ne disposant pas de la dernière version du génome de *Medicago truncatula* (V4.0), un blast a été réalisé en utilisant le programme Blast + v2.2.26 (Camacho *et al.*, 2009) afin de vérifier la spécificité de ces amorces. Un ajout de nucléotides aux extrémités des amorces a parfois été nécessaire pour atteindre la température de fusion de 55°C. Ces nucléotides ont été choisis afin de ne pas provoquer ni l'autocomplémentarité de l'amorce ni la formation de dimères entre amorces. Les amorces utilisées sont présentées dans le **Tableau B-25**.

Tableau B-25 : Séquences des amorces utilisées pour le clonage.

Medtr7g070440 : F-box protein interaction domain protein, Medtr7g070480 : SEC14 cytosolic factor family protein; oligo A et oligo B (Schwab, 2005).

Nom des amorces	Séquences des amorces (5' -> 3')	Application	Température d'hybridation	
			KAPA HiFi DNA polymerase	Taq polymérase standard
oligo A	CTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAC	amiR	65°C	55°C
oligo A-topo	CACCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAC	amiR	65°C	55°C
oligo B	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAG	amiR	65°C	55°C
I_ Medtr7g070440	GATCTTAGCTCGACAATGACCGTTCTCTTTGTATTCC	amiR	65°C	55°C
II_ Medtr7g070440	GAACGGTCATTGTGCGAGCTAAGATCAAAGAGAATCAATGA	amiR	65°C	55°C
III_ Medtr7g070440	GAACAGTCATTGTGCTGCTAAGTTCACAGGTCGTGATATG	amiR	65°C	55°C
IV_ Medtr7g070440	GAACCTAGCACGACAATGACTGTTCTACATATATATTCCT	amiR	65°C	55°C
I_ Medtr7g070480	GATAGACGCAGAGTTATTGGCGTCTCTCTTTGTATTCC	amiR	65°C	55°C
II_ Medtr7g070480	GACGGCCAATAACTCTGCGTCTATCAAAGAGAATCAATGA	amiR	65°C	55°C
III_ Medtr7g070480	GACGACCAATAACTCAGCGCTTTTCACAGGTCGTGATATG	amiR	65°C	55°C
IV_ Medtr7g070480	GAAAGACGCTGAGTTATTGGTCTGCTACATATATATTCCT	amiR	65°C	55°C
Medtr7g070440_F_cds	CACCATGGAACCACAAACCTTCATCTGTGA	cds	62°C	52°C
Medtr7g070440_R_cds	GCTTACCATGGTGGAACTAACTTGGTACAT	cds	62°C	52°C
Medtr7g070480_F_cds	CACCATGGAAGAAGAGCACTCTTCATCTT	cds	62°C	52°C
Medtr7g070480_R_cds	GGCGCTATTTGATTTTGAGGCTTAATTGCA	cds	62°C	52°C

Tableau B-26 : Mélange réactionnel pour la PCR haute fidélité pour un échantillon.

Produits	Concentration mère	Volume (µL)
ADN	0,25 ng/µL	4
KAPA HiFi tampon PCR	5 x	10
KAPA dNTPs	10 mM	1,5
Amorce sens	10 µM	1,5
Amorce anti-sens	10 µM	1,5
KAPA HiFi DNA polymerase	1 U/µL	1
H ₂ O	-	30,5

Tableau B-27 : Programme PCR haute fidélité.

Etapas	Nombre de cycles	Température	Temps
Dénaturation préliminaire	1 cycle	95°C	3 min
Dénaturation	35 cycles	98°C	20 sec
Hybridation		*	15 sec
Elongation		72°C	30 sec/kb
Elongation finale	1 cycle	72°C	1 min

*cf. Tableau B-25 pour obtenir la température d'hybridation.

Obtention des amiRs et ADNc par PCR haute fidélité

L'ensemble des PCR nécessaires aux étapes initiales de clonage des amiRs et des ADNc ont été réalisées avec le KAPA HiFi PCR kit (Kapabiosystems, référence KK2101) afin de limiter les erreurs de réplifications lors des réactions PCR. Les mélanges réactionnels et les programmes PCR utilisés sont présentés dans les **Tableau B-26** et **Tableau B-27**. Toutes les PCR sont réalisées avec le thermocycleur GeneAmp®PCR System 9700.

Tous les produits PCR ont été déposés sur gel d'agarose 1,5%. Leur extraction et purification ont été réalisées avec le Gel Extraction/PCR and DNA Fragment Purification Kit (Neo Biotech, référence NB-03-0178). Le poids de chaque portion de gel d'agarose contenant les produits PCR a été déterminé puis le tampon de solubilisation de gel BD a été ajouté avec un ratio de 10 µL de solution pour 10 mg de gel. Le mélange est incubé à 55°C pendant 10 minutes. Puis, le mélange est transféré dans une Quick Gel Extraction Column et laissé 2 minutes à incuber à température ambiante. Les colonnes sont centrifugées à 12000 rpm pendant 1 minute. Le liquide présent dans le tube collecteur est jeté.

Deux étapes de lavage ont lieu en ajoutant 500 µL de tampon de lavage PE, en centrifugeant à 12000 rpm pendant 1 minute et en jetant le liquide collecté. Afin de retirer complètement les résidus de tampon de lavage, les colonnes sont de nouveau centrifugées à 12000 rpm pendant 3 minutes.

Après centrifugation, les colonnes sont transférées dans de nouveaux microtubes de 1,5 mL, 50 µL de tampon d'élution préalablement préchauffé à 65°C sont déposés au centre des colonnes. Après 2 minutes d'incubation à température ambiante, les colonnes sont centrifugées 1 minute à 12000 rpm. Les produits PCR extraits sont élués dans les microtubes de 1,5 mL.

Pour purifier les produits PCR, 50 µL de tampon BD sont ajoutés dans chaque microtube, la solution obtenue est mélangée vigoureusement. La solution est transférée dans une Quick Gel Extraction Column et laissée 2 minutes à incuber à température ambiante. Les étapes suivantes jusqu'à l'élution des produits PCR purifiés dans de nouveaux microtubes sont identiques à celles réalisées lors de l'extraction des produits PCR.

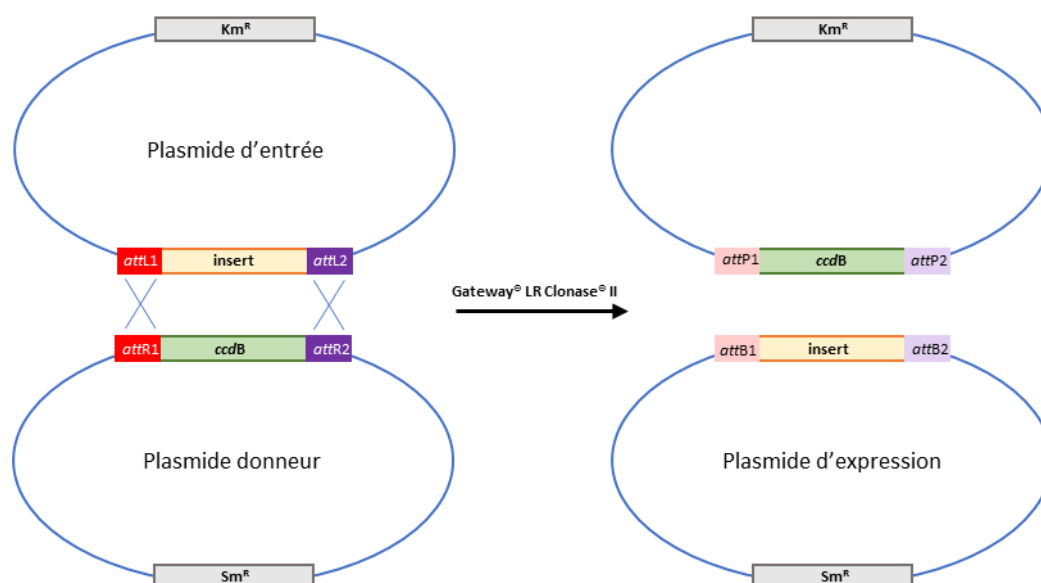


Figure B-12 : Illustration de la technologie de clonage GATEWAY™.

Dans cet exemple, le plasmide d'entrée est résistant à la kanamycine (Km^R), le plasmide donneur à la streptomycine (Sm^R). Gateway® LR Clonase® est un mélange d'enzymes nécessaires à la recombinaison. *ccdB*, gène encodant une protéine interférant avec les gyrases d'*E. coli*. *attX* : sites de recombinaison (Hartley, 2000).

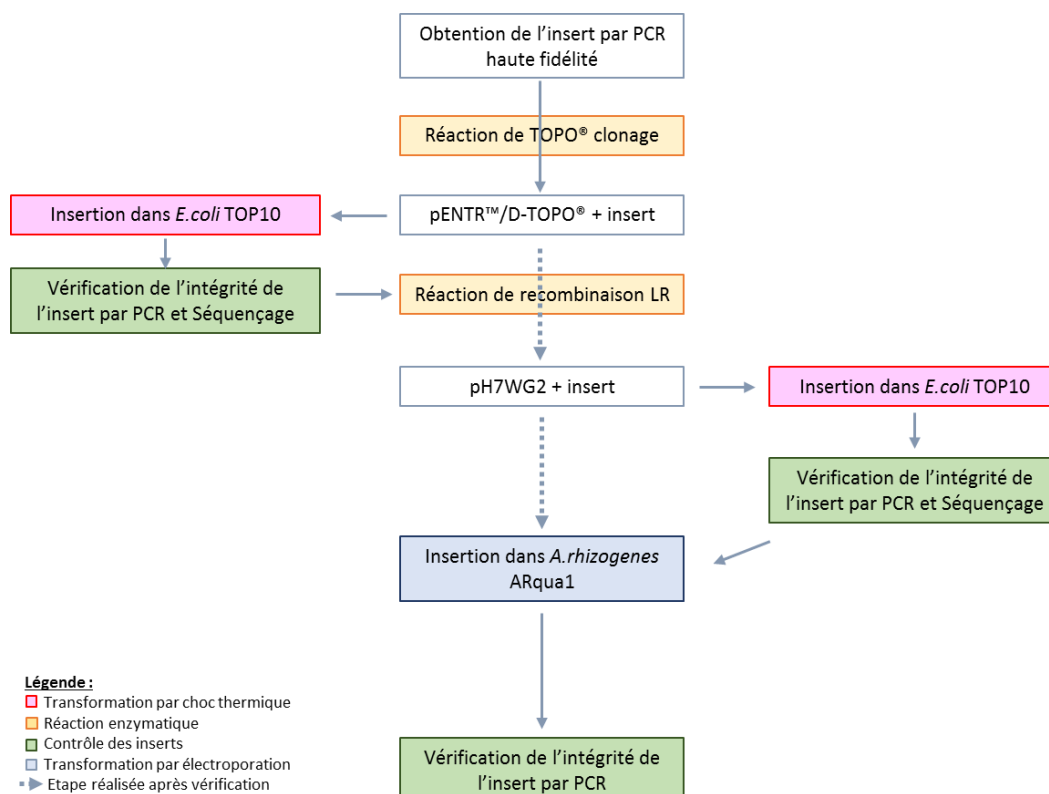


Figure B-13 : Illustration des étapes du clonage : de l'insert à l'obtention du plasmide d'expression dans *Agrobacterium rhizogenes*.

b. Obtention et insertion des plasmides d'expression des amiRs et ADNc dans
Agrobacterium rhizogenes

La technologie GATEWAY™ (Invitrogen™) a été utilisée pour cloner l'insert (amiR ou ADNc) dans le plasmide d'expression pH7WG2. Cette méthode a pour principal avantage de faciliter le transfert d'un insert d'un plasmide d'expression à un autre (par exemple pour modifier le gène de résistance, ou le promoteur). Elle est basée sur la recombinaison spécifique *in vitro* des sites *att*L1-gène-*att*L2 du plasmide d'entrée avec les sites *att*R1-gène-*att*R2 du plasmide donneur grâce à des intégrases de bactériophage λ (Hartley, 2000). La recombinaison provoque le remplacement du gène *ccdB* du plasmide donneur par l'insert désiré pour obtenir le plasmide d'expression final. L'utilisation de l'antibiotique de sélection du plasmide donneur et d'une souche d'*E. coli* non résistante à la protéine *ccdB* tel que TOP10 permet ensuite d'isoler les clones ayant intégré le plasmide d'expression (**Figure B-12**).

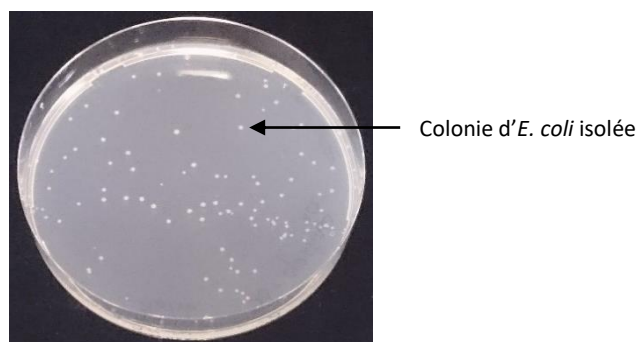
Avec cette technologie, plusieurs étapes intermédiaires sont nécessaires de l'obtention de l'insert (amiR ou ADNc) à l'insertion du plasmide d'expression dans *Agrobacterium rhizogenes*. La **Figure B-13** résume ces étapes. La première étape correspond à la ligation de l'insert dans le vecteur d'entrée dans le plasmide d'entrée pENTR™/D-TOPO® par la réaction de TOPO® clonage (page 179) puis à l'insertion du plasmide dans *E. coli* TOP10 par choc thermique (page 181). Après obtention de colonies isolées, cinq à huit cultures liquides des clones sont réalisées et leur ADN plasmidique est extrait par miniprep (page 181) afin de vérifier l'intégrité de l'insert par PCR et séquençage Sanger (page 173). L'étape suivante consiste à obtenir l'amiR ou l'ADNc dans le plasmide d'expression pH7WG2. Pour cela l'ADN plasmidique de pH7WG2 est extrait en plus grande quantité par midiprep (page 183) avant de réaliser la réaction de recombinaison LR (page 185). Le produit de la réaction LR est ensuite inséré par choc thermique dans *E. coli* TOP10 (page 181), les plasmides de cinq à huit colonies obtenues sont extraits et les inserts sont séquencés (pages 173 et 181). Le plasmide d'expression pH7WG2 contenant l'amiR ou l'ADNc peut ensuite être inséré dans *Agrobacterium rhizogenes* ARqua1 par électroporation (page 185). Pour achever le clonage, l'ADN plasmidique de cinq à huit colonies d'*Agrobacterium rhizogenes* ARqua1 est extrait par miniprep (page 181) et une PCR de vérification est réalisée (page 173) avant de débiter les transformations génétiques des racines de *Medicago truncatula*.

Réaction de TOPO® clonage

Après obtention de l'insert par PCR, il est inséré dans un vecteur d'entrée en utilisant le pENTR™/D-TOPO® Cloning Kit (Invitrogen™, référence K2400-20). Dans ce kit, le vecteur d'entrée double brin est linéarisé, l'un des brins possède une extrémité 3' GTGG et des topoisomérases I provenant du virus *Vaccinia* sont liées à chacune des extrémités du vecteur. Cette enzyme a la capacité d'effectuer la

Tableau B-28 : Souches bactériennes et conditions de sélection.

Espèce	Souche	Plasmide	Antibiotique(s) de sélection	Concentration de sélection
<i>E. coli</i>	DH5 α	pRS300	Ampicilline	100 $\mu\text{g/mL}$
<i>E. coli</i>	DB3.1	pH7WG2	Chloramphénicol Streptomycine/ Spectinomycine	25 $\mu\text{g/mL}$ 50 $\mu\text{g/mL}$
<i>E. coli</i>	TOP10	pENTR™/D-TOPO® + insert	Kanamycine	50 $\mu\text{g/mL}$
<i>E. coli</i>	TOP10	pH7WG2 + insert	Spectinomycine	100 $\mu\text{g/mL}$
<i>A. rhizogenes</i>	ARqua1	pH7WG2 + insert	Spectinomycine	200 $\mu\text{g/mL}$

**Figure B-14 : Colonies isolées d'*E. coli* après transformation par choc thermique.**

ligation de l'insert dans le plasmide d'entrée. La ligation directionnelle de l'insert est assurée par la présence des nucléotides CACC à l'extrémité 5' du produit PCR (Cheng and Shuman, 2000).

Pour réaliser cette réaction, 2 µL de produit PCR frais, 1 µL de solution de sels, 2 µL d'eau stérile, et 1 µL de vecteur pENTR™/D-TOPO® sont délicatement mélangés dans un microtube de 0,2 mL, incubés pendant 5 minutes à température ambiante puis placés sur glace avant transformation des bactéries *E. coli* TOP10 par choc thermique.

Transformation d'*Escherichia coli* par choc thermique

Les bactéries *E. coli* TOP10 fournies avec le pENTR™/D-TOPO® Cloning kit sont chimiquement compétentes. Pour leur transformation, 2 µL de la solution Réaction de TOPO® clonage ou de la réaction GATEWAY™ sont ajoutés à un tube d'*E. coli*, mélangés délicatement et incubés pendant 20 minutes sur glace. Le tube est ensuite placé à 42°C pendant 30 secondes, puis transféré immédiatement sur glace. 250 µL de LB sont ajoutés puis le tube est placé à agitation à 200 rpm à 37°C pendant 1 heure. 50 µL et 220 µL de bactéries sont étalés sur LB + antibiotique de sélection (**Tableau B-28**). Les boîtes de Petri sont incubées pendant 16 heures à 37°C, temps nécessaire à l'apparition de colonies isolées (**Figure B-14**).

Cinq à huit colonies par construction sont ensuite prélevées et mises en culture liquide dans 4 mL de LB + antibiotique de sélection (**Tableau B-28**) pendant 16h à 37°C et sous agitation à 200 rpm. 500 µL de glycérol à 50% sont ajoutés à 500 µL de chaque suspension bactérienne afin de conserver les souches à -80°C, l'ADN plasmidique du reste de la culture est extrait afin de vérifier par PCR et séquençage l'intégrité de l'insert.

Extraction d'ADN plasmidique par miniprep

L'extraction miniprep a été effectuée avec le High Purity Plasmid Miniprep Kit (Neo Biotech, référence NB-03-0002). La culture bactérienne d'un volume maximum de 5 mL est récoltée en centrifugeant pendant 2 minutes à 8000 rpm. Le culot est resuspendu dans 250 µL de solution de resuspension. La suspension est ensuite transférée dans un microtube de 1,5 mL. 250 µL de solution de lyse sont ajoutés, la solution est homogénéisée en retournant 6 fois le microtube et laissée incubée 5 minutes à température ambiante. La lyse est stoppée en ajoutant 350 µL de solution de neutralisation et en homogénéisant par 6 retournements les microtubes. Puis le tube est centrifugé pendant 10 minutes à 12000 rpm. Le surnageant est transféré dans une colonne de purification, incubé pendant 2 minutes à température ambiante puis elle est centrifugée 1 minute à 12000 rpm. Le liquide se trouvant dans le tube collecteur est jeté.

Comme dans le protocole précédent, trois étapes de lavages sont nécessaires : d'abord par l'ajout de 500 μ L de tampon de lavage PB dans la colonne et une centrifugation d'1 minute à 12000 rpm puis par l'ajout en deux étapes de 500 μ L de tampon de lavage W suivi de centrifugations d'1 minute à 12000 rpm. Afin d'éliminer tout résidu de tampon, la colonne est centrifugée 2 minutes à 12000 rpm.

La colonne est ensuite placée sur un nouveau tube collecteur de 1,5 mL, 50 μ L de tampon d'élution sont ajoutés. La colonne est laissée 2 minutes à température ambiante avant d'être centrifugée 2 minutes à 12000 rpm. La quantité d'ADN plasmidique obtenue est de l'ordre de 1,5 μ g, soit une concentration de 30 ng/ μ L.

Extraction d'ADN plasmidique par midiprep

Pour effectuer une midiprep, le GeneJET Plasmid Midiprep Kit (Thermo Scientific, référence K0482) a été utilisé. La culture bactérienne de 50 mL possédant une DO (Densité Optique) entre 2 et 3 (soit 18 heures de culture) est récoltée en la centrifugeant pendant 10 minutes à 5000 g. Le culot est resuspendu dans 2 mL de solution de resuspension contenant 80 μ L de RNase A. 2 mL de solution de lyse sont ensuite ajoutés, la solution est délicatement mélangée en retournant le tube 6 fois. La solution est laissée à incuber pendant 3 minutes à température ambiante.

Pour neutraliser la solution de lyse, 2 mL de solution de neutralisation sont ajoutés, la solution est homogénéisée en retournant le tube 8 fois.

Puis, 0,5 mL de réactif de liaison des endotoxines (Endotoxin Binding Reagent) sont ajoutés, la solution est de nouveau homogénéisée avant d'être laissée 5 minutes à température ambiante. Le rôle de ce réactif est d'éviter la contamination de l'ADN plasmidique par des endotoxines (ou lipopolysaccharides), composés présents au sein des membranes cellulaires des bactéries Gram négatives telles que *E. coli*. Après ajout de 3 mL d'éthanol 96%, la solution est homogénéisée avant d'être centrifugée pendant 40 minutes à 5000 g.

Le surnageant est transféré dans un tube de 15 mL, 3 mL d'éthanol 96% sont ajoutés, la solution est mélangée avant d'être placée dans la colonne. La colonne est ensuite centrifugée 3 minutes à 2000 g. Le liquide présent dans le tube collecteur est jeté.

Trois étapes successives de lavage ont ensuite lieu, d'abord en ajoutant 4 mL de solution de lavage I et en centrifugeant 2 minutes à 3000 g puis en ajoutant deux fois 4 mL de solution de lavage II et en centrifugeant 2 minutes à 3000 g. Après ce dernier lavage, le tube est centrifugé 5 minutes à 3000 g afin d'éliminer tout résidu de solution de lavage.

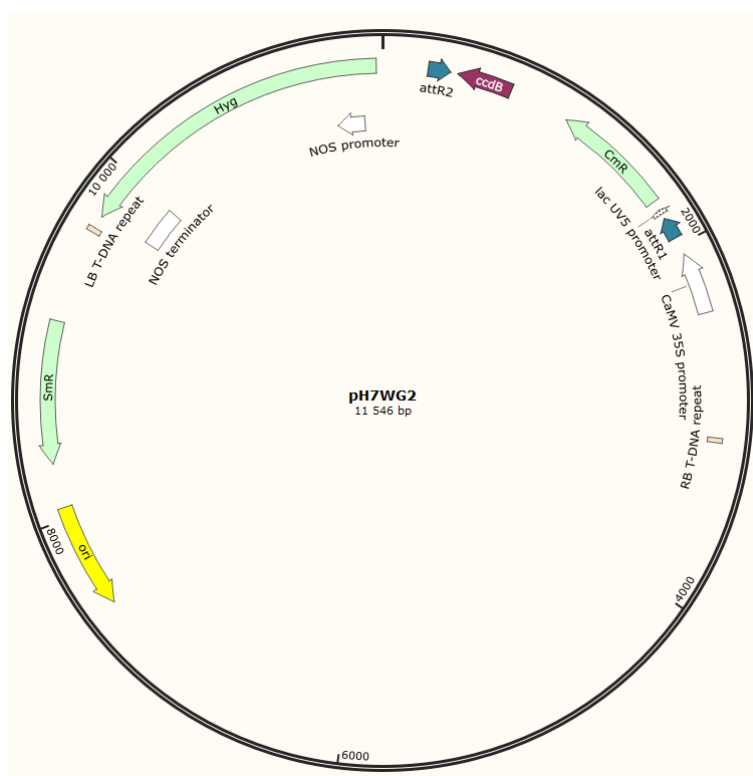


Figure B-15 : Carte du plasmide pH7WG2 (adapté de Karimi *et al.*, 2002).

Tableau B-29 : Mélange réactionnel pour la réaction de recombinaison LR pour un échantillon.

Produits	Concentration mère	Volume (µL)
Vecteur d'entrée	25 ng/µL	4
Vecteur donneur	150 ng/µL	1
TE pH 8.0	10 mM Tris-HCl 1 mM Na ₂ EDTA	3

La colonne est ensuite placée sur un nouveau tube collecteur de 1,5 mL, 0,35 mL de tampon d'élution sont ajoutés. La colonne est laissée 2 minutes à température ambiante avant d'être centrifugée 5 minutes à 3000 g afin d'obtenir une grande quantité d'ADN plasmidique (70 µg environ dans un volume de 350 µL, soit une concentration de 200 ng/µL).

Réaction de recombinaison LR

L'amiR ou l'ADNc est transféré du vecteur d'entrée vers le vecteur donneur grâce au mélange d'enzyme Gateway® LR Clonase® II (Invitrogen™, référence 11791020).

Le vecteur donneur utilisé ici est le plasmide pH7WG2 (Karimi *et al.*, 2002). Il comprend notamment un promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur qui contrôle l'expression de l'insert, un gène de résistance à l'hygromycine contrôlé par un promoteur NOS (nopaline synthase) pour sélectionner les racines transformées, un gène de résistance à la spectinomycine et à la streptomycine afin de sélectionner les colonies bactériennes après réaction de recombinaison LR et un gène de résistance au chloramphénicol afin de s'assurer de l'intégrité de la cassette *attR1-ccdB-attR2* avant réaction de recombinaison LR (**Figure B-15**).

Après avoir préparé le mélange réactionnel du **Tableau B-29**, 2 µL de Gateway® LR Clonase® II sont ajoutés. La solution est incubée 1 heure à 25°C, puis 10 minutes à 37°C après ajout d'1 µL de protéinase K de concentration 2 µg/µL. 2 µL de cette solution sont utilisés pour transformer des *E. coli* TOP10 selon le protocole de transformation chimique décrit précédemment.

Électroporation d'*Agrobacterium rhizogenes* ARqua1

Avant l'électroporation, les *Agrobacterium rhizogenes* ARqua1 sont rendues électro-compétentes. Pour cela, 100 mL d'une suspension de bactéries d'une densité optique de 0,1 sont préparés à partir d'une pré-culture incubée 48 heures à 28°C sous agitation à 200 rpm. Cette suspension est incubée pendant 3 heures dans les mêmes conditions que la pré-culture.

La culture bactérienne est transférée dans des bouteilles stériles préalablement refroidies dans de la glace. Toutes les étapes suivantes sont effectuées dans la glace. Les bouteilles sont centrifugées 10 minutes à 4000 rpm à 4°C. Un maximum de surnageant est éliminé.

Puis trois lavages successifs sont réalisés en ajoutant 80 mL d'eau UHQ (ultra haute qualité) stérile froide, en centrifugeant 10 minutes à 4000 rpm à 4°C et en jetant le surnageant.

A l'issue des étapes de lavage, le culot est resuspendu dans 5 mL d'une solution de glycérol à 10% froid et stérile puis les bouteilles sont centrifugées 10 minutes à 4000 rpm à 4°C.

Un maximum de surnageant est éliminé, le culot est délicatement resuspendu dans la solution restante. Des aliquots de 40 µL dans des microtubes de 200 µL stériles sont réalisées. Les bactéries compétentes sont conservées à -80°C.

Pour éviter tout arc électrique lors de l'électroporation, 10 µL de plasmide sont dialysés 1 heure sur une membrane MF-Millipore (diamètre des pores 0,025 µM, référence VSWP02500).

1,5 µL de plasmide dialysé sont ajoutés aux 40 µL d'*Agrobacterium rhizogenes* ARqua1 compétentes puis transférés dans une cuve d'électroporation d'une largeur de 1 mm, stérile et froide. La cuve est laissée 5 minutes à incuber dans la glace.

L'électroporation est réalisée avec le Gene Pulser® II Electroporation System (BIO-RAD) avec les paramètres suivants : capacité de 25 µF, résistance de 400 ohms et tension de 1,5 KV. Le pulse est d'une durée de 9 millisecondes.

Afin de relancer la croissance bactérienne, 800 µL de LB sont ajoutés dans la cuve pour resuspendre les bactéries. Elles sont ensuite transférées dans un microtube de 1,5 mL et mises à incuber 2 heures à 28°C sous agitation à 200 rpm.

La suspension bactérienne est ensuite étalée sur LB (50 µL, boîte témoin) et sur LB + spectinomycine 200 µg/mg (50 µL, 200 µL et 500 µL). Après incubation à 28°C pendant 2 jours, les colonies d'*Agrobacterium rhizogenes* apparaissent.

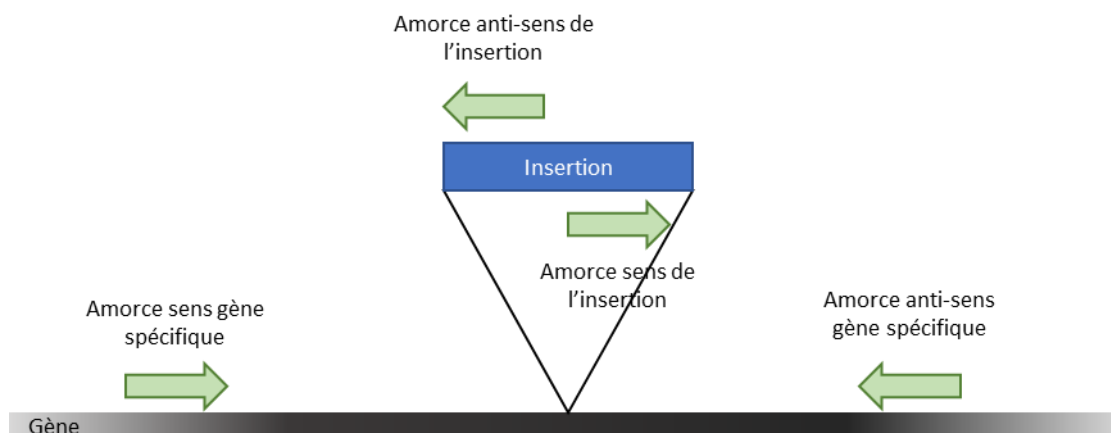


Figure B-16 : Schéma explicatif du génotypage des mutants d'insertion de *Medicago truncatula* et *Lotus japonicus*.

Ce schéma représente le cas d'une insertion sens du rétrotransposon. Il n'est pas à l'échelle, les rétrotransposons *Tnt1* et *LORE1* ont respectivement des tailles de 5334 bp et 5406 bp. La présence de l'insert empêche l'amplification du produit PCR gène spécifique (GSP).

Dans le cas d'une insertion anti-sens du rétrotransposon, les amorces sens et anti-sens de l'insert sont à inverser.

Tableau B-30 : Interprétation des résultats de génotypage des mutants d'insertion *M. truncatula* et *L. japonicus*.

Ces résultats illustrent le cas d'une insertion sens du rétrotransposon. Dans le cas d'une insertion anti-sens du rétrotransposon, les couples d'amorces à utiliser sont amorces GSP sens et insertion sens, amorces GSP anti-sens et insertions anti-sens.

Amorces GSP sens et GSP anti-sens	Amorces GSP sens et insertion anti-sens	Amorces insertion sens et GSP anti-sens	Génotype
O	N	N	Homozygote sauvage
O	O	O	Hémizygote
N	O	O	Homozygote mutant

GPS : Gène spécifique, O : amplification du produit PCR, N : pas d'amplification du produit PCR.

3. Quantification de *Verticillium* dans les tiges de *Medicago truncatula* par PCR quantitative.

La quantité d'ADN de *Verticillium alfalfae* V31-2 est exprimée relativement à la quantité d'ADN de *Medicago truncatula* dans chaque échantillon par qPCR (Toueni *et al.*, 2016). Pour quantifier l'ADN de *Medicago truncatula*, le gène de ménage Medtr2g008050 codant pour une protéine actine a été utilisé (Ariel *et al.*, 2010 et **Tableau B-12**).

Pour quantifier l'ADN fongique, les amorces codant pour un marqueur SCAR (sequence-characterized amplified region) caractérisé par (Larsen *et al.*, 2007)) ont été sélectionnées. Cette équipe a testé les amorces sens vert853F-CGAGTTCGCGGCAGGTA et anti-sens vert927R-GGCCACGCTAGCCTTCACTA avec d'autres pathogènes tels que *Aphanomyces euteiches* et *Fusarium oxysporum* et d'autres espèces de *Verticillium* (*Verticillium dahliae*) et a montré qu'elles seraient spécifiques à *Verticillium alfalfae*.

Le KAPA SYBR® FAST qPCR Kit (Kapa Biosystems, référence KK4605) est utilisé pour réaliser les qPCR. Le mélange réactionnel est présenté dans le **Tableau B-11**. Lors de la qPCR, 50 ng d'ADN génomique sont utilisés par réaction pour quantifier l'ADN végétal, 100 ng d'ADN pour quantifier l'ADN fongique. Le programme qPCR est présenté dans **Tableau B-13**. Il est effectué dans l'ABI PRISM® 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems).

Les résultats obtenus sont analysés avec le logiciel SDS 2.3 (Applied Biosystems). La quantité relative d'ADN fongique est estimée en calculant avec $\Delta Ct = Ct_{SCAR_Va} - Ct_{actine_Medicago}$: un ΔCt faible atteste de la présence de *Verticillium alfalfae* V31-2 dans les parties aériennes de *Medicago truncatula* et inversement, lorsque le ΔCt est élevé, il n'y a pas de *Va* V31-2 dans les parties aériennes de la plante.

Tableau B-31 : Amorces pour le génotypage des mutants d'insertion chez *Lotus japonicus* et *Medicago truncatula*.

Désignation	Nom des amorces	Séquences des amorces (5' -> 3')	Mutants
	P2 ^a	CCATGGCGGTTCCGTGAATCTTAGG	<i>Lotus japonicus</i>
Amorces GSP	Lj1g2391210_Foward	TGCGGACAATGTAGCGATAAGCAGCA	<i>Lotus japonicus</i>
	Lj1g2391210_Reverse	TGGTCCCCCAAAACCAGCTTCTGA	<i>Lotus japonicus</i>
	Tnt1_Foward ^b	ACAGTGCTACCTCCTCTGGATG	<i>Medicago truncatula</i>
	Tnt1_Reverse ^b	CAGTGAACGAGCAGAACCTGTG	<i>Medicago truncatula</i>
Amorces GSP	NF17607_R1_Foward	TGGTTCATGTGGGGTGT	<i>Medicago truncatula</i>
	NF17607_R1_Reverse	GGAAAGGAAACAATCACAAGCAG	<i>Medicago truncatula</i>
	NF20967_R0_Foward	TCCCTCAAAACCAACAAAAGAACC	<i>Medicago truncatula</i>
	NF20967_R0_Reverse	GCCGGCACCGCTAGTAATT	<i>Medicago truncatula</i>

^a(Urbański *et al.*, 2012) ; ^b(Cheng *et al.*, 2014). Les séquences des amorces GSP (Gene Specific Primer) des lignées mutantes de *Lotus japonicus* ont été fournies avec les mutants. Les séquences des amorces GSP des lignées mutantes de *Medicago truncatula* ont été désignées par nos soins.

Tableau B-32 : Programme PCR en "touchdown" utilisé pour le génotypage des mutants *LORE1* *Lotus japonicus* et avec les amorces gène spécifique/*Tnt1* chez les mutants *Tnt1* de *Medicago truncatula*.

Etapes	Nombre de cycles	Température	Temps
Dénaturation préliminaire	1 cycle	95°C	3 min
Dénaturation	10 cycles	95°C	30 sec
Hybridation		*	30 sec
Elongation		72°C	***
Dénaturation	30 cycles	95°C	30 sec
Hybridation		**	30 sec
Elongation		72°C	1 min 30 sec
Elongation finale	1 cycle	72°C	10 min

* de 67°C à 62°C (-0,5°C par cycle) pour les PCRs gène spécifique et P2 gène spécifique sens de *Lotus japonicus*, 5 cycles à 60°C et 5 cycles à 57,5°C pour la PCR gène spécifique/*Tnt1* chez *Medicago truncatula*

**62°C pour les PCRs gène spécifique et P2 gène spécifique sens de *Lotus japonicus*, 55°C pour la PCR gène spécifique/*Tnt1* chez *Medicago truncatula*

***1 min 30 sec pour les PCRs gène spécifique et P2 gène spécifique sens de *Lotus japonicus*, 2 min 30 sec pour la PCR gène spécifique/*Tnt1* chez *Medicago truncatula*

Tableau B-33 : Programme PCR utilisé pour le génotypage des mutants d'insertion *Tnt1* de *Medicago truncatula* avec les amorces GSP sens et anti-sens.

Etapes	Nombre de cycles	Température	Temps
Dénaturation préliminaire	1 cycle	94°C	4 min
Dénaturation	38 cycles	94°C	30 sec
Hybridation		55°C	30 sec
Elongation		72°C	1 min 30 sec
Elongation finale	1 cycle	72°C	6 min

4. Génotypage de mutants d'insertion d'intérêt chez *Medicago truncatula* et *Lotus japonicus*

Le génotypage des mutants d'insertion d'intérêt chez *Medicago truncatula* et *Lotus japonicus* (lignées décrites **Tableau B-3** et **Tableau B-5**) est effectué par PCR. Le principe général de ce génotypage est présenté par les **Figure B-16** et **Tableau B-30** : au moins deux réactions PCR sont nécessaires. Elles doivent être réalisées avec les amorces gènes spécifiques (GSP) sens et anti-sens encadrant le site d'insertion du rétrotransposon, et avec une amorce spécifique au rétrotransposon et une amorce gène spécifique. La première PCR réalisée avec les amorces GSP permet d'identifier les individus possédant au moins une copie du gène fonctionnel. La seconde PCR utilisant une amorce GSP et une amorce rétrotransposon spécifique permet d'identifier les individus possédant au moins une copie mutée du gène par insertion du rétrotransposon. Ainsi, pour les individus homozygotes sauvages, seul le produit PCR gène spécifique est amplifié. Pour les individus mutants homozygotes, seul le produit PCR issu de la réaction utilisant une amorce gène spécifique et une amorce rétrotransposon spécifique est amplifié. Un produit PCR est amplifié pour chacune des réactions PCR pour les individus hémizygotes.

Le **Tableau B-31** regroupe les séquences des amorces utilisées pour le génotypage des lignées de mutants *Tnt1* et *LORE1*. Le mélange réactionnel utilisé est identique à celui du **Tableau B-19**. Deux types de programme PCR sont utilisés : un cycle PCR classique pour l'amplification du produit gène spécifique chez les mutants d'insertion *Tnt1* de *Medicago truncatula* et un programme PCR en « touchdown » pour les autres réactions (Urbański *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2014). Ce type de programme avec une température d'hybridation élevée lors des 10 premiers cycles PCR permet d'augmenter la spécificité de la PCR.

B. MATERIEL ET METHODES

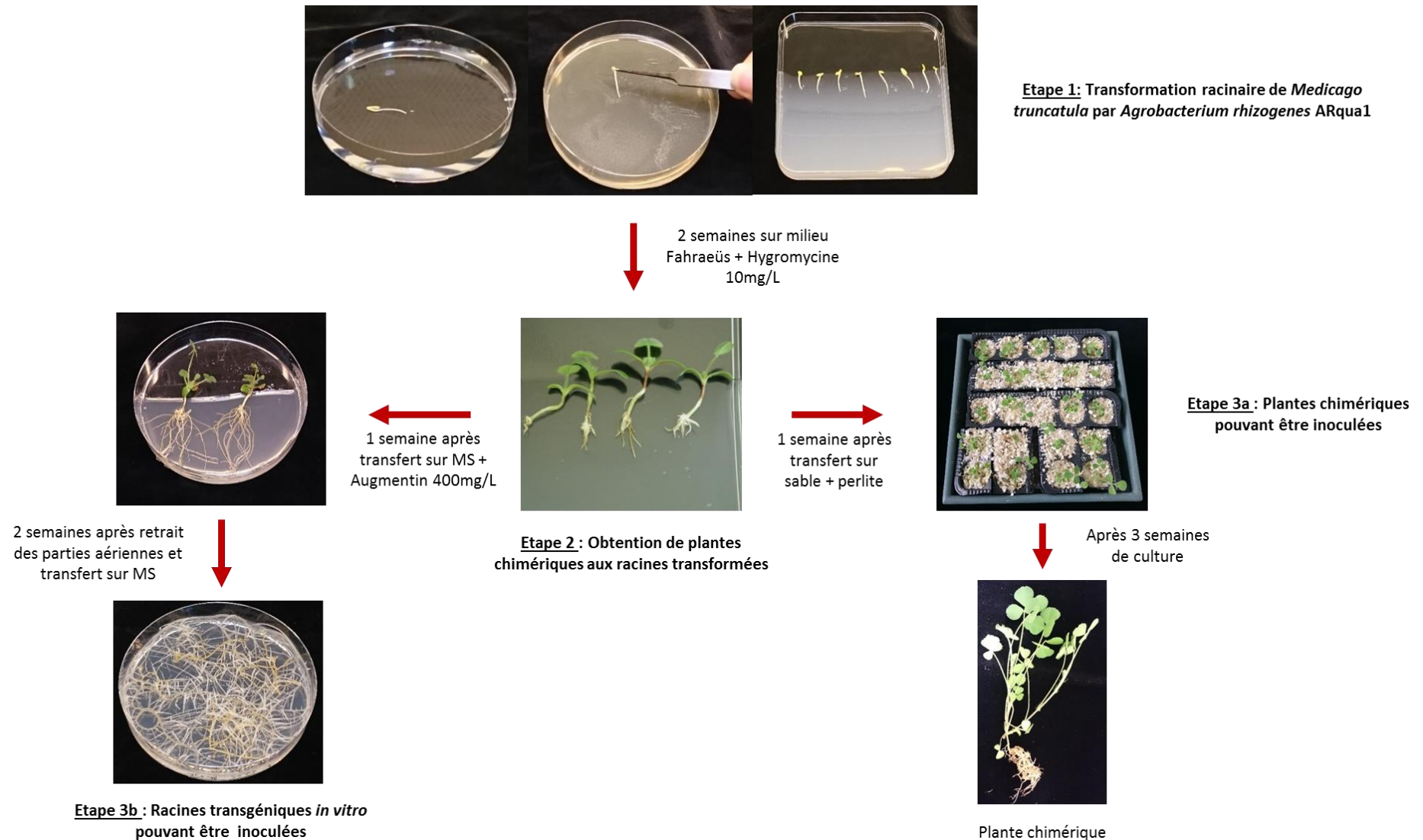


Figure B-17 : Illustration de la transformation racinaire de *Medicago truncatula* pour l'obtention des plantes chimériques et des racines transgéniques (ou hairy roots).

La première étape de transformation racinaire est identique pour les deux systèmes de culture (étape 1). Après obtention des plantes chimériques (étape 2), elles sont soit transférées dans un substrat sable+perlite pour être inoculées (étape 3a) ou leurs racines sont prélevées pour réaliser des cultures *in vitro* (étape 3b).

VI. Transformation des plantes par *Agrobacterium rhizogenes*

Pour transformer les racines de *Medicago truncatula*, les germinations stériles obtenues comme décrit précédemment (page 137) d'une longueur de 0,5 cm à 2 cm sont transférées dans de l'eau stérile afin de retirer complètement le tégument de la graine puis de sectionner 2 à 3 mm de radicule. Elles sont ensuite frottées sur un tapis bactérien d'*Agrobacterium rhizogenes* ARqua 1 et déposées sur des boîtes de Petri carrée (12x12 cm) contenant du milieu Fahraeus + hygromycine à 10 mg/L coulé de façon inclinée. Chaque boîte contient 8 germinations (**Figure B-17**, étape 1). Les boîtes sont parafilmées, une entaille est réalisée à leurs coins supérieurs afin de favoriser les échanges gazeux des jeunes plantules. Un cache est ensuite déposé afin de protéger les racines de la lumière. Les boîtes sont inclinées à 80° et mises 1 semaine en phytotron à 20°C avec photopériode de 16h pour favoriser la croissance bactérienne et la transformation. Elles sont ensuite transférées dans un phytotron avec 16h de jour à 25°C et 8h de nuit à 23°C pour favoriser la croissance des plantules (Boisson-Dernier *et al.*, 2001).

Pour obtenir un tapis bactérien de bonne qualité pour la transformation, il faut ensemer une boîte de LB + streptomycine à 50 µg/mL puis incubé 2 jours à 28°C. Puis une préculture dans un volume de 4mL de LB + streptomycine à 50 µg/mL est mise à incubé pendant 1 jour à 28°C et sous agitation à 200 rpm. 300 µL de préculture sont ensuite étalés sur des boîtes de Petri contenant du LB + streptomycine à 50 µg/mL et mis à incubé une journée à 28°C. Une boîte de Petri peut servir à transformer 40 plantes. Pour assurer une croissance optimale des bactéries, les boîtes ne doivent pas être parafilmées.

Deux semaines après transformation, des plantes chimériques sont obtenues. Leurs racines se caractérisent par une boursouffure au niveau de la coupure de la racine et par un développement anarchique de racines à partir de ce renflement (**Figure B-17**, étape 2). Plusieurs systèmes de cultures ont été développés à partir de cette étape.

1. Cultures de plantes entières chimériques aux racines transgéniques

Des inoculations de plantes chimériques ont été réalisées *in vitro* : après 2 semaines sur milieu Fahraeus + hygromycine à 10 mg/L, les plantes chimériques sont transférées dans de nouvelles boîtes contenant du papier de germination humide déposé sur du milieu Fahraeus. Les boîtes ont été ensuite placées de nouveau dans un phytotron avec une photopériode de 16h à 25°C et 8h de nuit à 23°C pendant 1 semaine avant d'être inoculée par *Verticillium alfalfae* V31-2 tel que décrit précédemment (cf. page 149).

Tableau B-34 : Nombre d'événements de transformation obtenus pour les hairy roots par fond génétique et par vecteur.

Fonds génétiques	Vecteurs		
	Vecteur vide	amiR SEC14	Surexpression SEC14
A17	6	7	5
F83005.5	3	5	5
SA03780	3	3	4

L'autre système de culture mis en place consiste à transférer les plantes chimériques âgées de 2 semaines dans des alvéoles contenant un mélange sable/perlite (2/3 de sable, 1/3 de perlite). Les alvéoles sont disposées dans des plateaux de dimension 18,5x18,5 cm contenant 300 mL de milieu Fahraeus liquide. Les plateaux sont placés dans un phytotron à 21°C avec une photopériode de 16h jour/8h nuit et recouverts d'une boîte en plexiglass transparent de dimensions 15x20x40 cm. Cette boîte est progressivement ouverte et complètement retirée au bout de 6 jours. Elle permet d'acclimater progressivement les plantes chimériques. Le Fahraeus liquide joue également un rôle dans cette acclimatation puisqu'en plus d'apporter des nutriments, il contribue à maintenir un micro-climat humide au niveau des plantes chimériques (**Figure B-17**, étape 3a).

Une semaine après leur transfert, les plantes chimériques sont inoculées par *Verticillium alfalfae* V31-2 tel que décrit précédemment (cf. page 149).

2. Cultures de racines transgéniques

Pour obtenir les racines cultivées *in vitro* (Thomas *et al.*, 1992), les plantes chimériques obtenues après 2 semaines passées sur milieu Fahraeus + hygromycine à 10 mg/L sont transférées sur milieu MS + augmentin à 400 µg/mL. Après avoir de nouveau mis des caches sur les boîtes pour maintenir les racines à l'obscurité, elles sont placées dans un phytotron à 25°C /23°C avec une photopériode 16h jour/ 8h nuit durant 10 jours. Les parties aériennes des plantes sont ensuite retirées et les racines transgéniques transférées dans de nouvelles boîtes de milieu MS + augmentin à 400 µg/mL. Elles sont ensuite mises à l'incubateur à 24°C dans l'obscurité pendant 10 jours (Pollier *et al.*, 2011). Le milieu utilisé ne comprenant pas d'hormones, seules les racines transformées se développent et continuent de croître (**Figure B-17**, étape 3b). En effet, le segment du plasmide Ri (root-inducing) transféré à la plante (T-DNA) contient un set de gènes qui contrôle la biosynthèse d'auxines et de cytokinines (Shanks and Morgan, 1999; Guillon *et al.*, 2006). A l'issue de ces 10 jours, les racines peuvent être transférées sur milieu MS et inoculées par *Verticillium alfalfae* V31-2 tel que décrit précédemment (cf. page 149).

Le **Tableau B-34** récapitule le nombre d'événements de transformation obtenus par fond génétique et par vecteur. L'analyse de l'expression du gène Medtr7g070480 codant pour une protéine SEC14 a permis de choisir les événements de transformation utilisés lors des expériences de validation fonctionnelle de ce gène.

Les cultures *in vitro* de racines transgéniques (hairy roots) sont repiquées toutes les trois à quatre semaines. En cas de contamination bactérienne ou fongique, les cultures sont transférées deux fois en un mois sur MS + augmentin à 400 µg/mL pour les purifier avant d'être de nouveau repiquées sur MS.

C. RÉSULTATS

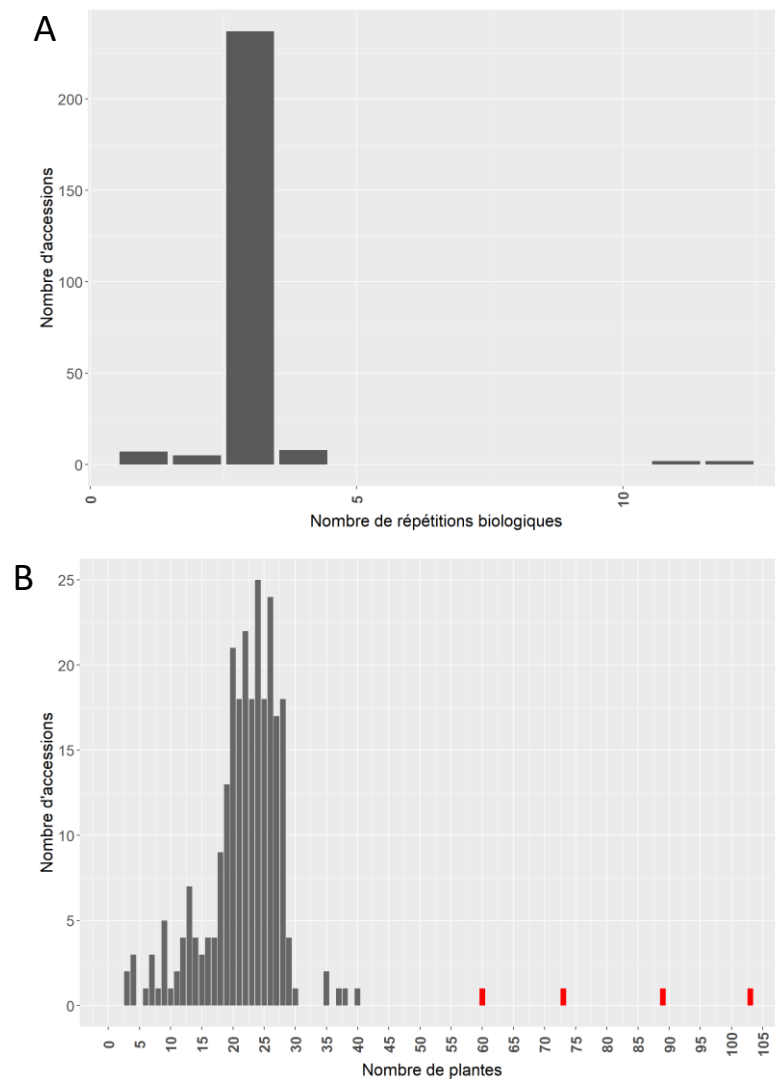


Figure C-1 : Histogrammes représentant le nombre de répétitions par accession (A) et le nombre de plantes par accession (B) dont la réponse à *Verticillium alfalfae* V31-2 a été étudiée.

Les quatre accessions en rouge en B correspondent aux lignées « Check » A17, F83005.5, DZA315.16 et DZA45.6.

I. Biodiversité de la réponse à la verticilliose aux niveaux de l'espèce et intra-population chez *Medicago truncatula*

1. Analyse de la biodiversité de la réponse à *Va* V31-2 au sein de l'espèce *Medicago truncatula* par évaluation de la collection MtHapMap

L'analyse de la biodiversité de la réponse à *Va* V31-2 chez *Medicago truncatula* a été réalisée chez 261 accessions naturelles (246 accessions appartenant au projet Hapmap (www.medicagohapmap.org/) et 15 accessions tunisiennes (Annexe, **Tableau F-2**, page 407). En moyenne, trois répétitions biologiques pour chaque accession (soit en moyenne 22 plantes par accession, **Figure C-1**) ont été réalisées en utilisant un plan en bloc augmenté (*cf.* Matériels et Méthodes, page 157). L'évolution des symptômes de flétrissement de chaque plante durant un mois après inoculation par le champignon et le taux de ré-isollement du pathogène à partir des tissus des plantes infectées pour chaque accession en fin d'expérience ont été évalués.

a. Evolution des symptômes de flétrissement foliaire

L'évolution des symptômes de flétrissement a été décrite selon différents index de maladie dont le MSS (Maximum Symptom Score) qui correspond à la sévérité de la maladie, l'AUDPC (Area Under the Disease Progress Curve) qui est un phénotype permettant de quantifier l'évolution de la maladie au cours du temps. Une modélisation par un modèle logistique des courbes de symptômes a également été réalisée pour quantifier de façon précise la progression de la maladie. Les paramètres de cette modélisation sont : Asym (sévérité de la maladie en fin d'expérience), xmid (temps nécessaire pour atteindre 50% d'Asym) et scal (temps nécessaire pour passer de 50% à 75% d'Asym, *cf.* Matériels et Méthodes, page 155).

La **Figure C-2** est une illustration de l'évolution des symptômes de flétrissement chez un sous-ensemble de 64 accessions de *M. truncatula*. On y distingue des accessions résistantes telles que la lignée de référence A17 ou DZA45.6 caractérisées par une valeur du paramètre Asym très faible (respectivement, 0,36 et 0,99) et des accessions sensibles telles que TN9.22 et TN7.17 avec des valeurs d'Asym respectives de 3,82 et 3,57 sur une échelle de 4 (respectivement encadrées en vert et rouge sur la **Figure C-2-B**). Au sein des accessions sensibles notamment, la vitesse d'évolution du développement des symptômes n'est pas toujours la même. L'AUDPC et le paramètre xmid de modélisation logistique des données de suivi de symptômes permettent de quantifier cette différence de développement des symptômes. Les accessions TN1.12 et D7.1.3 (encadrées en bleu sur la **Figure C-2-B**) possèdent un Asym proche à 3,56 et 3,71 mais D7.1.3 atteint la moitié de son score maximum de symptômes plus de 4 jours avant TN1.12 (respectivement 12,9 et 17,2 jours). Il existe chez certaines

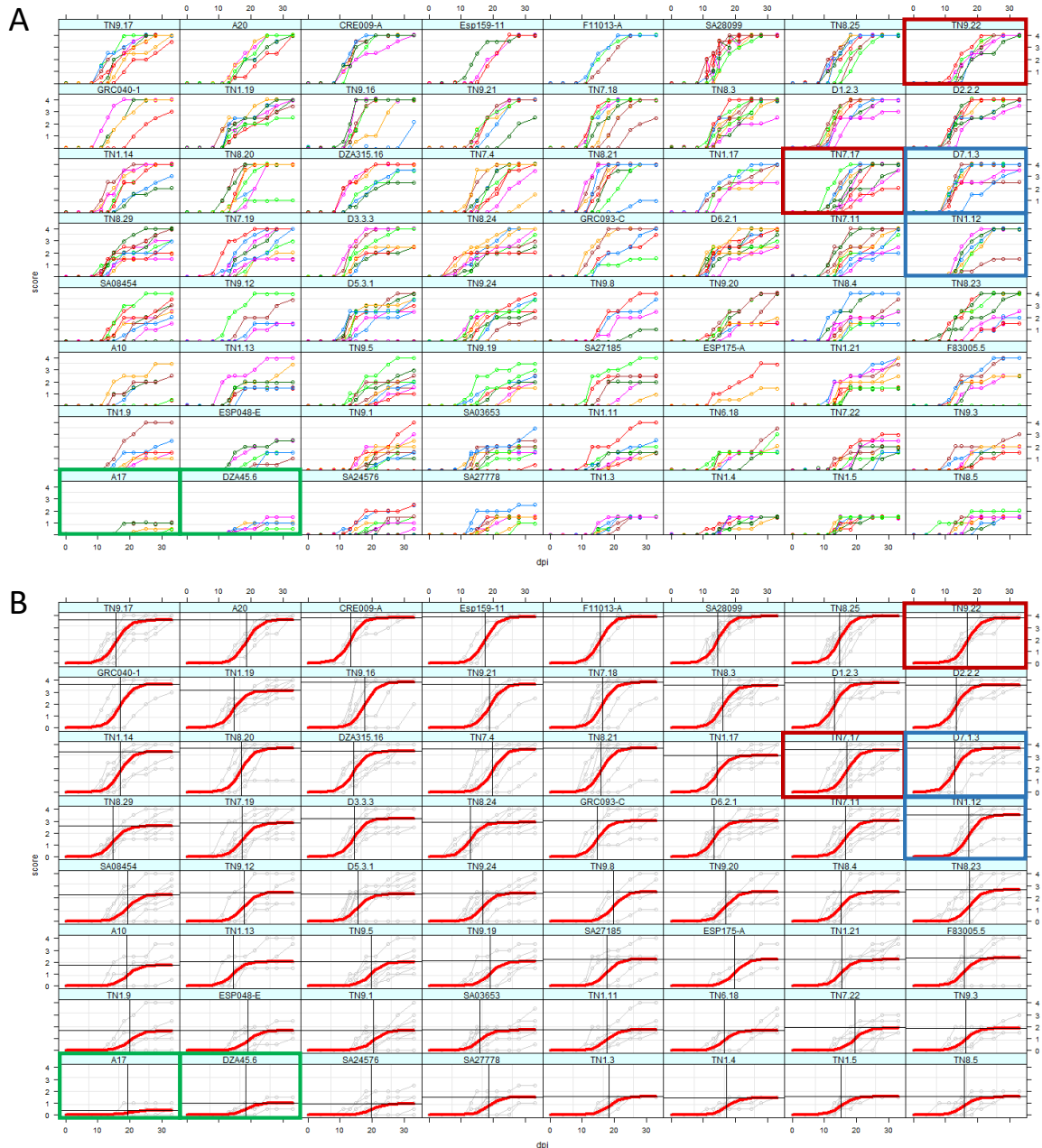


Figure C-2 : Développement des symptômes de flétrissement chez un sous-ensemble de 64 accessions de *Medicago truncatula* inoculées par *Verticillium alfalfae* V31-2.

Les symptômes de flétrissement sont notés avec une échelle de 0 à 4 (score) durant 32 jours après inoculation (dpi).

A. Données brutes. Chaque courbe de couleur représente l'évolution des symptômes d'une plante.

B. Données modélisées selon un modèle mixte non linéaire implémentant une courbe logistique. Les courbes grises correspondent aux courbes de suivi de symptômes de chaque plante. Les courbes rouges correspondent aux courbes de modélisation des symptômes pour chaque accession. La droite horizontale correspond au paramètre Asym (indice maximum de maladie), la droite verticale au paramètre xmid (temps nécessaire pour atteindre 50% de l'indice maximum de maladie Asym).

Encadrées en vert, deux exemples d'accessions résistantes ; en rouge, deux exemples d'accessions sensibles ; en bleu, exemples d'accessions sensibles avec des vitesses de développement des symptômes différentes (paramètres de modélisation xmid différents).

Ces données ont été obtenues lors d'une répétition biologique.

C. RÉSULTATS

des accessions comme TN7.17 (encadrée en rouge sur la **Figure C-2 B**) une variabilité de la réponse à l'inoculation : certaines plantes de cette accession ont un MSS de 2 alors que la majorité d'entre elles présente un MSS de 4. Le génome de ces lignées étant supposé être fixé suite à plusieurs générations d'autofécondation, cette variabilité phénotypique au sein d'une même expérience pourrait être liée à de la plasticité phénotypique, ou à une modification du phénotype de maladie due à des variations du micro-climat au sein de la chambre de culture par exemple (Nicotra *et al.*, 2010).

C. RÉSULTATS

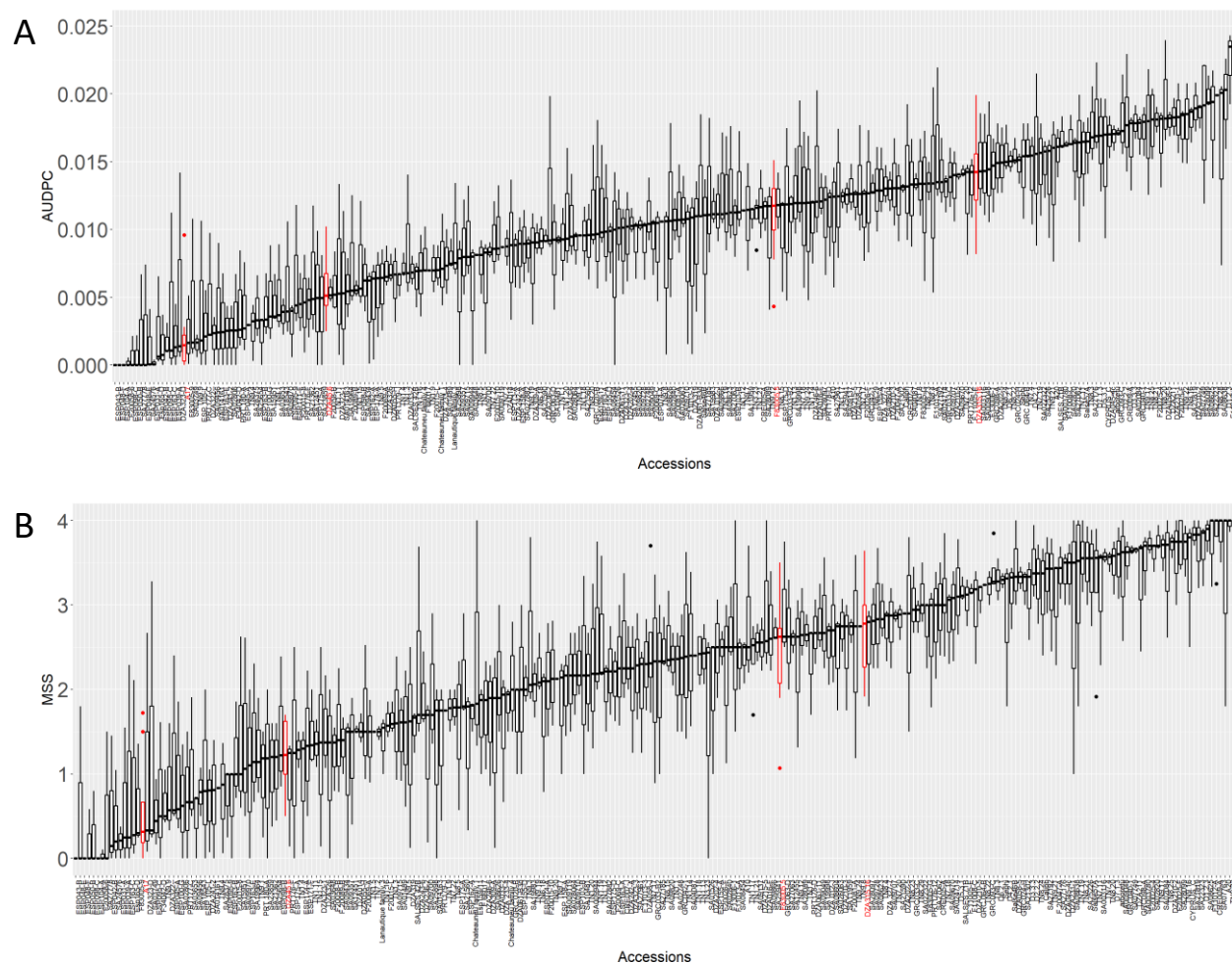


Figure C-3 : Boîtes à moustache représentant l’AUDPC (A) et le MSS (B) moyen ajusté par répétition des 261 accessions de *Medicago truncatula* quatre semaines après inoculation par *Verticillium alfalfae* V31-2.

Les quatre accessions en rouge (respectivement A17, DZA45.6, F83005.5 et DZA315.16) sont les accessions « check » présentes dans chacune des treize expériences. Pour la plupart des autres accessions, trois répétitions biologiques ont été effectuées (Annexe, **Tableau F-2**, page 407). Un nombre moyen de vingt-deux plantes par accession ont été inoculées. AUDPC : Area Under the Disease Progress Curve, MSS : Maximum Symptom Score.

C. RÉSULTATS

Les moyennes ajustées par répétition des phénotypes MSS et AUDPC de chaque accession sont présentées sous forme de boîtes à moustache dans la **Figure C-3** : cette représentation permet de visualiser la diversité de la réponse à *Va* V31-2 au sein des 261 accessions. De plus, on peut également constater que les lignées les plus résistantes et les lignées les plus sensibles ne sont pas les mêmes en fonction des phénotypes (le coefficient de corrélation des rangs Tau de Kendall entre les phénotypes MSS et AUDPC est de 0,799). Ce résultat souligne l'importance d'analyser plusieurs phénotypes afin de caractériser au mieux la réponse à *Verticillium alfalfae* V31-2 chez *Medicago truncatula*.

Une analyse de variance (ANOVA) sur la moyenne par répétition par accession des phénotypes MSS et AUDPC ainsi que sur les paramètres de modélisation Asym et xmid a montré un effet significatif de l'accession sur ces phénotypes. Les accessions présentent donc des vitesses initiales de développement de symptômes et un score de maladie final différents. En revanche, le paramètre scal ne varie pas significativement en fonction des accessions : la vitesse de développement de la maladie ne varie pas entre accessions lorsqu'elles atteignent la moitié de leur score maximum Asym (**Tableau C-1**).

L'analyse de variance a également mis en évidence un fort effet du facteur « répétition » (**Tableau C-1**). L'utilisation d'un plan en bloc augmenté pour le phénotypage de la collection a permis de corriger ces données brutes de l'effet « répétition » afin de les utiliser pour l'analyse de génétique d'association. En effet, les accessions « Checks » A17, DZA45.6, F83005.5 et DZA315.16 qui ont été évaluées lors de la plupart des expériences ont permis d'estimer l'effet « répétition » de ces différentes expériences et de calculer des valeurs moyennes ajustées de cet effet soit par la méthode des moyennes marginales (ou lsmeans), soit par la méthode des sommes des carrés de types I. En revanche, cet effet n'a pas pu être estimé pour la répétition « CC192_RV2A » où les lignées « Checks » n'ont pas pu être évaluées.

C. RÉSULTATS

Tableau C-1 : Tables d'ANOVA des phénotypes MSS, AUDPC, Asym, xmid et scal obtenus pour 261 accessions de *Medicago truncatula* inoculées par *Verticillium alfalfae* V31-2.

ddl : degré de liberté, AUDPC : Area Under the Disease Progress Curve, MSS : Maximum Symptom Score. ANOVA réalisée sans transformation de données afin de valider les postulats. Les valeurs des *P-values* sont indiquées.

Sources de variation	ddl	MSS	AUDPC	Asym	xmid	scal
Répétitions	12	$<2.e^{-16***}$	$<2.e^{-16***}$	$<2.e^{-16***}$	$<2.e^{-16***}$	$<2.e^{-16***}$
Accessions	260	$<2.e^{-16***}$	$<2.e^{-16***}$	$<2.e^{-16***}$	$7,62.e^{-7***}$	1
Résiduelle	537					



Figure C-4 : Colonisation des parties aériennes de 257 accessions de *Medicago truncatula* par *Verticillium alfalfae* V31-2 en fonction du MSS à quatre semaines après inoculation.

Une portion de tige de chaque plante est désinfectée puis mise en culture cinq jours sur du PDA contenant de la streptomycine. Le taux de réisolement de *Va* V31-2 correspond au nombre d'extrémités de tiges d'une accession colonisées par *Va* V31-2 divisé par le nombre total d'extrémités de tiges (cf. Matériel et Méthodes, page 151). Ce taux de réisolement est représenté en fonction du Maximum Symptom Score (MSS) de chaque accession (Moyenne des données corrigées par la méthode des moyennes marginales). La combinaison des informations de colonisation et de développement des symptômes de flétrissement permet de distinguer les accessions résistantes (MSS < 2,5 et taux de réisolement < 20%), les partiellement résistantes (MSS < 2,5 et 20% < taux de réisolement < 30%), les tolérantes (MSS < 2,5 et taux de réisolement ≥ 30%) et les sensibles (MSS ≥ 2,5).

Tableau C-2 : Table d'ANOVA pour le phénotype de Taux de réisolement pour 257 accessions de *Medicago truncatula* inoculées par *Verticillium alfalfae* V31-2.

ddl : degré de liberté. ANOVA réalisée sans transformation de données afin de valider les postulats. Les valeurs des *P-values* sont indiquées.

Sources de variation	ddl	Taux de réisolement
Répétitions	7	$7,28.e^{-11***}$
Accessions	256	$<2.e^{-16***}$
Résiduelle	249	

b. Taux de réisolement de *Verticillium alfalfae* V31-2

Quatre semaines après inoculation, une portion de tige de chaque plante est désinfectée puis mise en culture cinq jours sur du PDA contenant de la streptomycine. Le taux de réisolement de *Va* V31-2 correspond au nombre d'extrémités de fragments de tiges d'une accession colonisés par *Va* V31-2 divisé par le nombre total d'extrémités de fragments de tiges. L'objectif de cette expérience est de quantifier la présence de *Va* V31-2 vivant ayant colonisé les parties aériennes de *Medicago truncatula* (cf. Matériel et Méthodes, page 151).

L'ANOVA indique que le taux de réisolement diffère selon l'accession (*P-value* inférieure à $2 \cdot 10^{-16}$, **Tableau C-2**). Cette mesure a contribué à la mise en évidence de l'existence de différents mécanismes génétiques de réponse à *Verticillium alfalfae*. En effet, on peut distinguer les accessions résistantes (MSS inférieur à 2,5 et taux de réisolement inférieur à 20%), les accessions partiellement résistantes (MSS inférieur à 2,5 et taux de réisolement compris entre 20 et 30%), les accessions tolérantes (MSS inférieur à 2,5 et taux de réisolement supérieur ou égal à 30%) et enfin les accessions sensibles (MSS supérieur ou égal à 2,5) (**Figure C-4**). Pour les accessions sensibles, le taux de réisolement du champignon peut être faible comme SA07763 dont le taux de réisolement est de 27,7% alors que le MSS est de 4. Ceci peut s'expliquer soit par la destruction du pathogène présent dans les tissus végétaux lors de la désinfection des tiges lorsque ces dernières sont très nécrosées, soit parce que le pathogène n'a pas colonisé les parties aériennes de la plante et que les symptômes observés sont causés par la présence d'une toxine fongique.

Comme dans le cas des autres phénotypes décrivant le développement des symptômes de flétrissement, les données de réisolement ont été corrigées de l'effet « répétition » par la méthode des moyennes marginales (ou lsmeans) avant l'étude de génétique d'association.

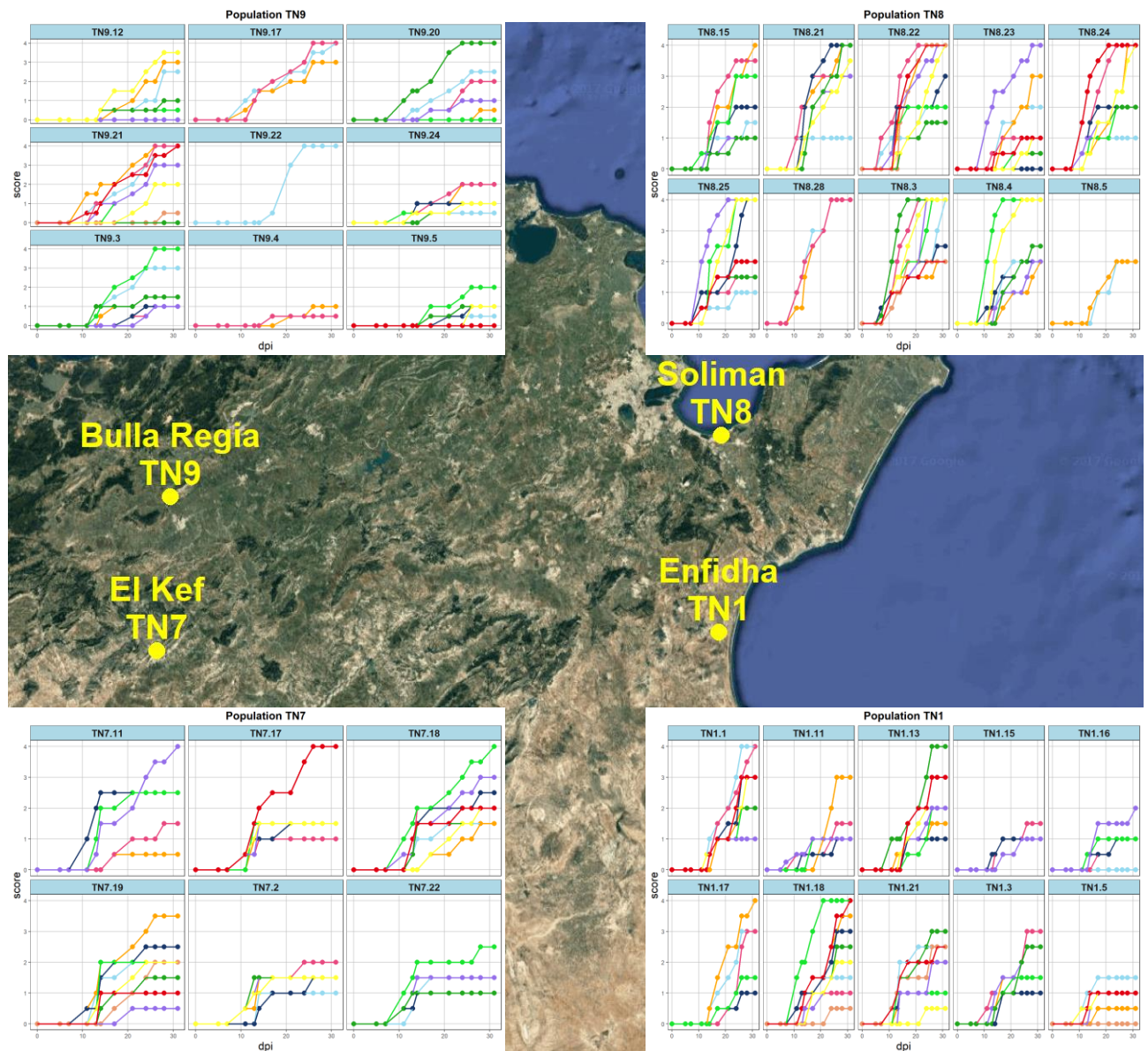


Figure C-5 : Localisation géographique des populations tunisiennes et réponse à *Verticillium alfalfae* V31-2.

La diversité de la réponse à *Verticillium alfalfae* V31-2 chez ces populations est illustrée par les graphiques montrant l'évolution du score de symptômes après inoculation. Chaque courbe de couleur représente l'évolution des symptômes d'une plante.

2. Analyse de la biodiversité de la réponse à *Va* V31-2 au sein de populations tunisiennes de *Medicago truncatula*

- a. TN1, TN7, TN8 et TN9 : des populations tunisiennes de *Medicago truncatula* très étudiées pour la réponse aux stress environnementaux.

Parmi les 261 accessions naturelles de *Medicago truncatula* analysées pour leur réponse à *V. alfalfae*, 57 appartiennent à quatre populations collectées dans des régions salines (régions de Soliman –TN8- et d’Enfidha –TN1-) et non salines (régions d’El Kef –TN7- et de Bulla Regia –TN9-) du nord tunisien (Lazrek *et al.*, 2009, **Figure C-5**). Ces populations ont déjà fait l’objet d’études sur l’adaptation locale en s’intéressant à leurs réponses aux stress biotiques (*Aphanomyces euteiches*) et abiotiques (salinité et sécheresse). Une des premières études a consisté à évaluer la réponse au stress salin de 106 lignées de *Medicago truncatula* provenant de onze différentes populations tunisiennes en mesurant quatorze traits quantitatifs au moment de la récolte de plantes traitées avec 50mM de NaCl ou sans NaCl. Cette étude met en évidence la tolérance à la salinité des populations de Soliman et Bulla Regi (Arraouadi *et al.*, 2011b). Ces mêmes lignées ont fait l’objet d’une évaluation de leur tolérance à la sécheresse. La plus grande part de la variabilité phénotypique de tolérance à la sécheresse a été observée au sein de ces populations (Badri *et al.*, 2016).

Quatorze populations tunisiennes de *Medicago truncatula* (soit 136 lignées) présentent également des réponses contrastées à l’inoculation par *Aphanomyces euteiches* allant de la sensibilité (Soliman) à la résistance complète (Jelma). De plus, il est intéressant de noter que 65,4% de la variation phénotypique totale est observée intra-population. Néanmoins, aucune association entre localisation géographique et résistance n’a été identifiée (Djébali *et al.*, 2013).

Une autre étude réalisée sur ces populations a eu pour but d’identifier des régions génomiques candidates à l’adaptation à la salinité. Pour cela, douze lignées de ces populations ont été génotypées, des marqueurs développés, et les polymorphismes entre populations et entre populations salines/non salines étudiés. Cette méthode a permis de mettre en évidence dix-huit régions génomiques impliquées dans l’adaptation à la salinité (Friesen *et al.*, 2010). Ces travaux ont été poursuivis en évaluant différents traits phénologiques tels que le diamètre des racines ou des tiges de 39 lignées reséquencées où des marqueurs SNPs ont été identifiés. Des gènes candidats à l’adaptation à la salinité ont été mis en évidence comme le gène Medtr3g098090, encodant une protéine CPK (Calcium-dependent Protein Kinase) dont les homologues chez *Arabidopsis thaliana* sont impliqués dans la voie hormonale de l’acide abscissique (Friesen *et al.*, 2014).

L’adaptation précoce à la salinité (germination et croissance de la plantule) a été étudiée chez 39 lignées appartenant aux populations TN1, TN7, TN8 et TN9 (lignées identiques à celles qui ont été

reséquencées). Les individus provenant des sites salins (TN1 et TN8) sont les plus tolérants à la salinité et à l'acide abscissique (hormone liée à la tolérance au stress biotique) (Cordeiro *et al.*, 2014).

La plasticité transgénérationnelle en réponse au stress salin et en présence de plantes compétitrices a été évaluée en comparant des phénotypes obtenus pour les descendants de populations issues des mêmes régions salines et non-salines décrites précédemment. Les phénotypes évalués sont le nombre de feuilles (marqueur de croissance végétative) ainsi que le nombre de fleurs à apparition précoce (potentiel reproducteur) de plantes dont les parents ont été cultivés ou non en condition saline. Le nombre de feuilles a permis de mettre en évidence le fait que les génotypes non salins sont de meilleurs compétiteurs que les génotypes salins et bénéficient de la présence des plantes compétitrices dans un environnement salin. Cette interaction n'est présente que lorsque les graines utilisées ont été reproduites dans un environnement non salin. Les génotypes salins présentent une plus grande tolérance à la salinité pour la floraison précoce que les génotypes non-salins. Les plantes possédant des compétiteurs ont une floraison plus précoce, peu importe leur origine. La plasticité transgénérationnelle concernant la croissance des plantes est influencée par l'interaction avec des plantes compétitrices et ne persiste que sur une génération (Castro *et al.*, 2013).

Cette plasticité transgénérationnelle a également été étudiée uniquement en présence d'un stress salin sur deux générations de plantes, en utilisant les 39 lignées appartenant aux quatre populations provenant des sites salins et non salins. Les descendants des populations TN1 et TN8 ont une biomasse et un nombre de gousses supérieur en condition de stress salin par rapport aux individus dérivés des populations non salines TN7 et TN9, montrant ainsi une adaptation locale. De plus, plus les parents de ces génotypes salins ont subi un stress salin et plus cette différence s'accroît. L'exposition des parents au sel stimule ainsi l'apparition de traits phénotypiques facilitant l'évitement du sel, tandis que l'exposition de leur descendance résulte dans l'apparition de traits associés à une plus grande tolérance. Les populations non salines expriment des traits associés à une grande croissance en l'absence du sel, alors que pour les populations salines « adaptées », la capacité de maintien des performances de la plante dans un environnement salin est aussi associée à une croissance potentielle plus faible en l'absence de sel (Moriuchi *et al.*, 2016).

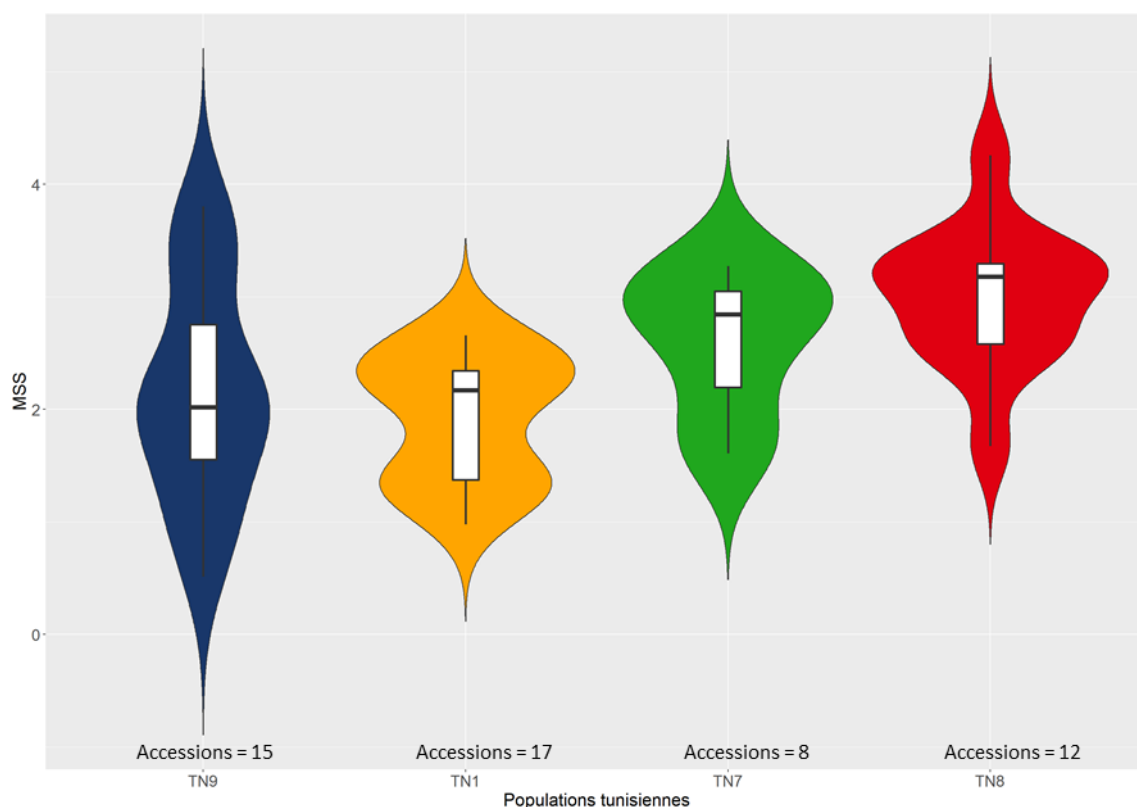


Figure C-6 : Distribution du MSS moyen ajusté par répétition des lignées tunisiennes de *Medicago truncatula* quatre semaines après inoculation par *Verticillium alfalfae* V31-2.

Les différentes lignées tunisiennes sont regroupées par population, le nombre de lignées pour lesquelles la réponse à Va V31-2 a été évaluée par population est indiqué sous chaque violin plot. Pour la plupart des accessions, trois répétitions biologiques ont été effectuées (Annexe, **Tableau F-2**, page 407). En moyenne, vingt-deux plantes par accession ont été inoculées.

MSS : Maximum Symptom Score. TN1 : Enfidha, TN7 : El Kef, TN8 : Soliman, TN9 : Bulla Regia

Tableau C-3 : Tables d'ANOVA des phénotypes MSS et AUDPC des 52 accessions tunisiennes de *Medicago truncatula* inoculées par *Verticillium alfalfae* V31-2 et appartenant aux populations TN1, TN7, TN8 et TN9.

ddl : degré de liberté, AUDPC : Area Under the Disease Progress Curve, MSS : Maximum Symptom Score. ANOVA réalisée sans transformation de données selon un modèle linéaire mixte afin de prendre en compte le fait que le facteur accession soit niché dans le facteur population. Les valeurs des *P-values* sont indiquées.

Sources de variation	ddl	MSS	AUDPC
Répétitions	4	4,69.e-9***	2,70.e-7***
Populations	3	1,82.e-3**	4,23.e-4***
Accessions dans Populations	1 ^a	8.e-14***	5.e-14***

^a ddl pour les effets aléatoires

C. RÉSULTATS

- b. Mise en évidence de variabilité de la réponse à *Va* V31-2 au sein de quatre populations du Nord de la Tunisie.

Les moyennes ajustées par répétition du phénotype MSS des accessions tunisiennes regroupées par population sont présentées sous forme de violin plot dans la **Figure C-6**. La distribution de ce phénotype de maladie montre une importante variation entre les populations. Des différences significatives entre les populations ont été observées (P -value : $1,82.e^{-9}$ pour le MSS et P -value : $4,23.e^{-4}$ pour l'AUDPC, **Tableau C-3**). En moyenne, la population TN1 dont dix-sept lignées ont été évaluées, est la population la plus résistante à *Verticillium alfalfae* V31-2 avec un MSS de 1,92. La population TN9 dont la réponse à *Va* V31-2 a été étudiée chez 15 lignées est celle où on peut observer les réponses les plus contrastées : des lignées résistantes telles que TN9.1 (MSS de 0,97) et des lignées sensibles comme TN9.22 (MSS de 3,82) la composent. Les populations TN7 (8 lignées) et TN8 (12 lignées) sont plutôt sensibles avec des MSS moyens respectivement de 2,60 et 3,00.

La diversité de la réponse à *Va* V31-2 au niveau intrapopulation a été évaluée en mettant en évidence des différences significatives en termes de MSS et AUDPC au sein d'une même population (P -value : $8.e^{-14}$ pour le MSS et P -value : $5.e^{-14}$ pour l'AUDPC, **Tableau C-3**). Cette analyse montre qu'il existe une biodiversité de la réponse à *Va* V31-2 à la fois entre les populations tunisiennes et au sein de chacune de ces populations.

Pour étudier de façon plus exhaustive cette réponse contrastée à *Va* V31-2 en utilisant un plus grand nombre d'accessions, la population TN9 paraît être une bonne candidate avec une variance de 0,97 pour le phénotype MSS. Néanmoins, peu de données génétiques sont disponibles sur cette population, c'est pourquoi la population TN8 Soliman a été choisie pour poursuivre cette étude (variance de 0,41 pour le phénotype MSS).

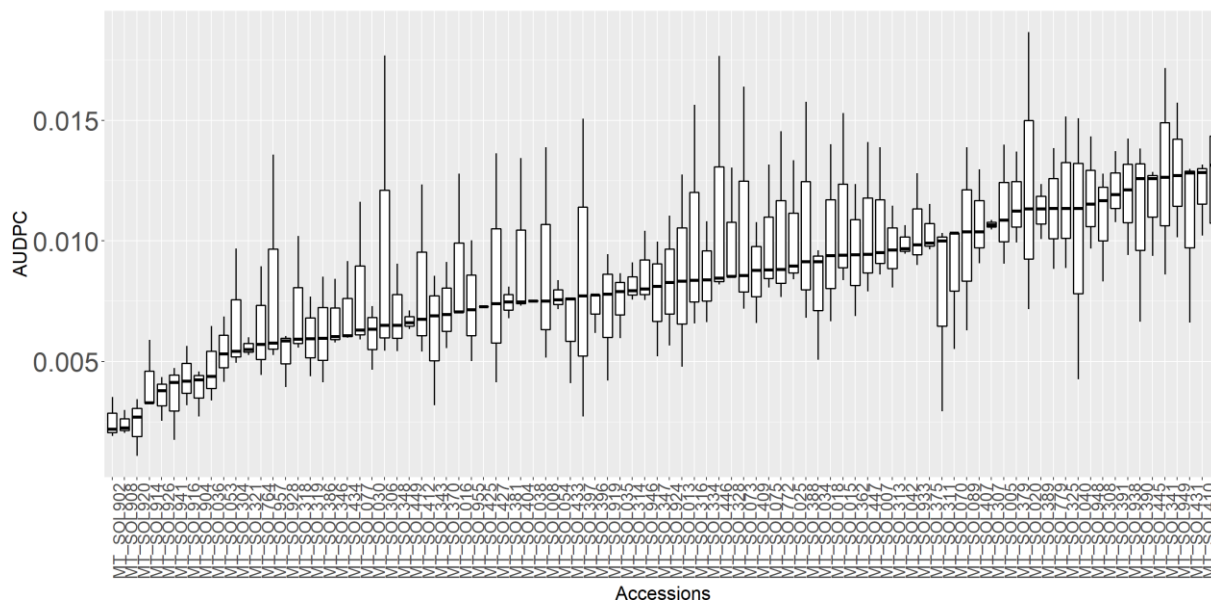


Figure C-7 : AUDPC des 90 accessions de la population tunisienne Soliman de *Medicago truncatula*. Les boîtes à moustaches ont été réalisées à partir des moyennes de l'AUDPC 30 jours après inoculation par *Va* V31-2 pour trois répétitions biologiques. En moyenne 24 plantes par accession ont été inoculées.



Figure C-8 : Répartition géographique des accessions de *Medicago truncatula* de la population Soliman.

Le gradient de couleurs des points symbolisant les accessions correspond au niveau du MSS moyen après inoculation par *Verticillium alfalfae* V31-2.

c. Analyse détaillée de la réponse à *Va* V31-2 au sein de la population Soliman (TN8)

Les accessions constituant la population Soliman (région se situant à 45 km au Sud-Est de Tunis, au bord du golfe de Tunis) ont été prélevées dans une plaine salée et font parties de différentes études sur l'adaptation à différents stress biotiques et abiotiques de populations tunisiennes de *Medicago truncatula*. Sur les 252 accessions originaires de la région de Soliman, 96 ont été sélectionnées en fonction de l'électro-conductivité des sols d'où elles sont originaires et ont été séquencées (48 accessions prélevées dans un sol aux faibles électro-conductivité (entre 0,66 et 3,48 dS/m) et 48 accessions issues de sols aux fortes électro-conductivités (3,58 et 17,01 dS/m), Wendy Vu, communication personnelle, Annexe **Tableau F-3**, page 415). La réponse à *Va* V31-2 de 90 des 96 lignées de la région de Soliman séquencées a été évaluée (celles dont nous disposons assez de graines).

Au sein des 90 accessions évaluées de cette population, une biodiversité de la réponse à *Verticillium alfalfae* V31-2 est observable. La **Figure C-7** est une représentation des valeurs d'AUDPC moyennes de trois répétitions biologiques. En moyenne, les accessions MT_SOL920, MT_SOL902, MT_SOL908, MT_SOL916 montrent peu de symptômes de flétrissement foliaire alors que 46 de ces accessions (soit 51%) sont sensibles avec un MSS supérieur à 2,5. La **Figure C-8** représente le MSS des accessions en fonction de leur répartition géographique sur le site : les accessions sensibles et les accessions les plus résistantes ne sont pas toutes regroupées en un unique lieu de prospection. De plus, aucune corrélation n'est observable entre le niveau d'électro-conductivité des sols et les phénotypes de maladie (coefficient de corrélation de Pearson R^2 respectivement de 0,121, 0,162 et 0,084 pour les phénotypes corrigés par la méthode des lsmeans AUDPC, MSS et Taux de réisolement).

L'analyse comparative des résultats de suivi de symptômes et de réisolement montre qu'il n'y a pas d'accessions complètement résistantes et seulement cinq lignées sont partiellement résistantes (MSS inférieur à 2,5 et taux de réisolement compris entre 20 et 30%) : la majorité des accessions sont sensibles (46) ou tolérantes (41) (**Figure C-9**).

L'ANOVA réalisée sur les trois phénotypes MSS, AUDPC et Taux de réisolement de *Va* V31-2 met en évidence une différence significative de ces phénotypes en fonction des lignées ($P\text{-value} < e^{-10}$, **Tableau C-4**). Il peut être intéressant de conduire une étude de génétique d'association sur ces données afin de mettre en évidence une source de résistance ou de sensibilité à *Verticillium alfalfae* V31-2 qui serait propre à cette population. Préalablement à l'analyse de GWAS, les moyennes phénotypiques de chaque accession seront corrigées de l'effet « répétition » par l'analyse des données dans un plan en bloc complet randomisé.

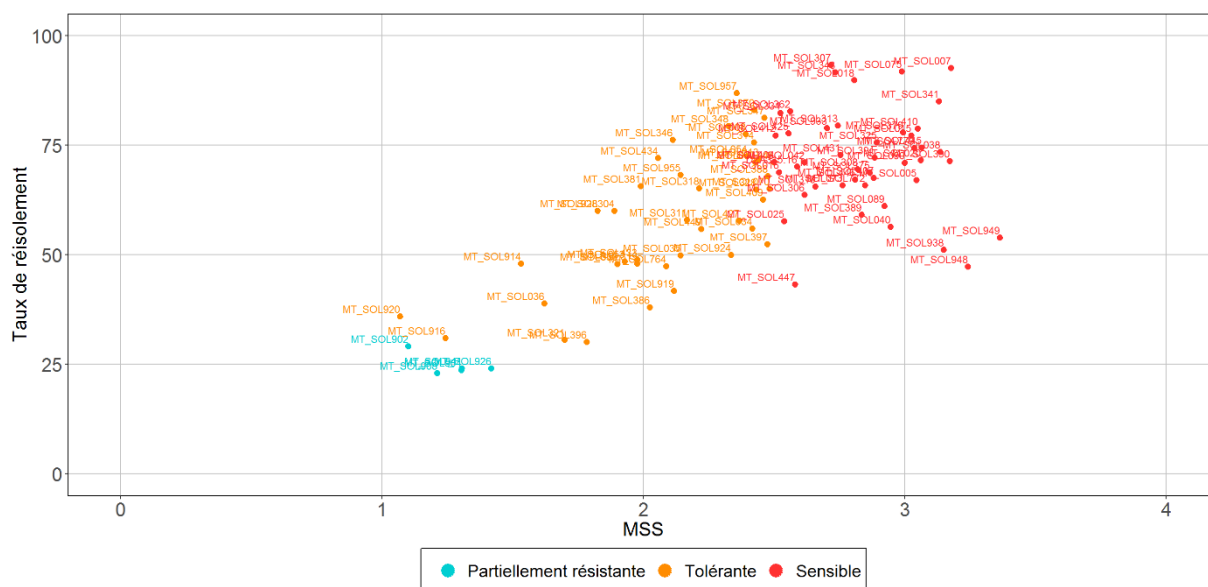


Figure C-9 : Colonisation des parties aériennes de 90 accessions de *Medicago truncatula* issues de la population tunisienne Soliman par *Verticillium alfalfae* V31-2 en fonction du MSS.

Le taux de réisolement de *Va* V31-2 correspond au nombre d'extrémités de tiges d'une accession colonisées par *Va* V31-2 divisé par le nombre total d'extrémités de tiges (cf. Matériel et Méthodes, page 151). Ce taux de réisolement est représenté en fonction du Maximum Symptom Score (MSS) de chaque accession (Moyenne des données corrigées par la méthode des moyennes marginales). La combinaison des informations de colonisation et de développement des symptômes de flétrissement permet de distinguer les accessions résistantes (MSS < 2,5 et taux de réisolement < 20%), les partiellement résistantes (MSS < 2,5 et 20% < taux de réisolement < 30%), les tolérantes (MSS < 2,5 et taux de réisolement ≥ 30%) et les sensibles (MSS ≥ 2,5).

Tableau C-4 : Tables d'ANOVA des phénotypes MSS, AUDPC et Taux de réisolement de *Verticillium alfalfae* des 90 accessions de la région de Soliman de *Medicago truncatula* inoculées par V31-2.

ddl : degré de liberté, AUDPC : Area Under the Disease Progress Curve, MSS : Maximum Symptom Score. ANOVA réalisée sans transformation de données afin de valider les postulats. Les valeurs des *P-values* sont indiquées.

Sources de variation	ddl	MSS	AUDPC	Taux de réisolement
Répétitions	2	1,40.e-6***	1,31.e-15***	4,48.e-5***
Accessions	89	5,09.e-16***	7,36.e-12***	4,87.e-10***
Résiduelle	173			

II. Identification de gènes candidats à la résistance à la verticilliose par génétique d'association

1. Analyse de génétique d'association de la collection *MtHapmap* et identification des gènes candidats

a. Résultats de l'analyse de génétique d'association

Les moyennes phénotypiques corrigées de l'effet « répétition » pour l'AUDPC, le MSS, le taux de réisolement ainsi que pour les paramètres de modélisation Asym et xmid ont été analysées par analyse GWAS : ce sont ces phénotypes et paramètres pour lesquels il existe des différences significatives entre les accessions après inoculation par *Verticillium alfalfae* V31.2 (**Tableau C-1** et **Tableau C-2**). Les *P-values* des analyses de génétique d'association obtenues en corrigeant les phénotypes par la méthode des moyennes marginales (lsmeans) étant les plus significatives, seules ces dernières sont présentées.

La **Figure C-10** présente sous forme de Manhattan plots les résultats de GWAS obtenus pour les phénotypes AUDPC, xmid et taux de réisolement selon un modèle linéaire mixte prenant en compte la structure de la population et l'apparentement entre individu (modèle dit 'Q + K') et établi comme étant le plus adapté à l'analyse des données grâce à l'analyse des diagrammes quantile-quantile (Annexe **Figure F-1**, page 419). Les Manhattan plots représentent la probabilité (exprimée en $[-\log_{10}(P\text{-value})]$) pour les 5 671 743 SNPs analysés d'être associés à une modification du phénotype de maladie au sein des 246 accessions de la collection *MtHapMap* évaluées pour leur réponse à *Va* V31-2. Le seuil de significativité de nos résultats par le critère de Bonferroni est de 8,05. Ce critère correspond au rapport du seuil de significativité global (5%) divisé par le nombre de tests effectués (c'est-à-dire le nombre de SNPs). Dans ce cas, aucune des *P-values* obtenues n'atteint ce seuil. En effet, le SNP le plus significatif (chr7 : 20050636) atteint un score de 7,33 pour le phénotype xmid. Ce seuil étant très strict (il ne tient pas compte du déséquilibre de liaison (LD) entre les SNPs, (Johnson *et al.*, 2010)), il a donc été décidé d'utiliser un seuil arbitraire fixé à 5 malgré le risque de présence de quelques faux-positifs. L'ensemble des 84 SNPs dépassant ce seuil ainsi que la localisation des gènes situés dans une fenêtre de 20kb de ces SNPs sont présentés en annexe (Annexe **Tableau F-5**, page 421). La colocalisation de ces gènes sous un QTL de résistance à *Verticillium* sp. (tels que précédemment décrits par Ben *et al.*(2013b)et Negahi *et al.*(2014)) ainsi que l'expression de ces gènes dans un pool de racines de *Medicago truncatula* moins de 24 heures après inoculation par *Verticillium alfalfae* V31-2 (Toueni *et al.*, 2016) sont également précisées dans ce tableau.

Le Manhattan plot du phénotype AUDPC permet de visualiser deux pics très nets de SNPs différents, le premier sur le chromosome 1, le second sur le chromosome 7. La présence de pics est liée au déséquilibre de liaison qu'il existe entre deux SNPs proches. Il y a également des SNPs isolés dépassant le seuil de 5 sur les chromosomes 1, 5 et 8 (**Figure C-10-A**).

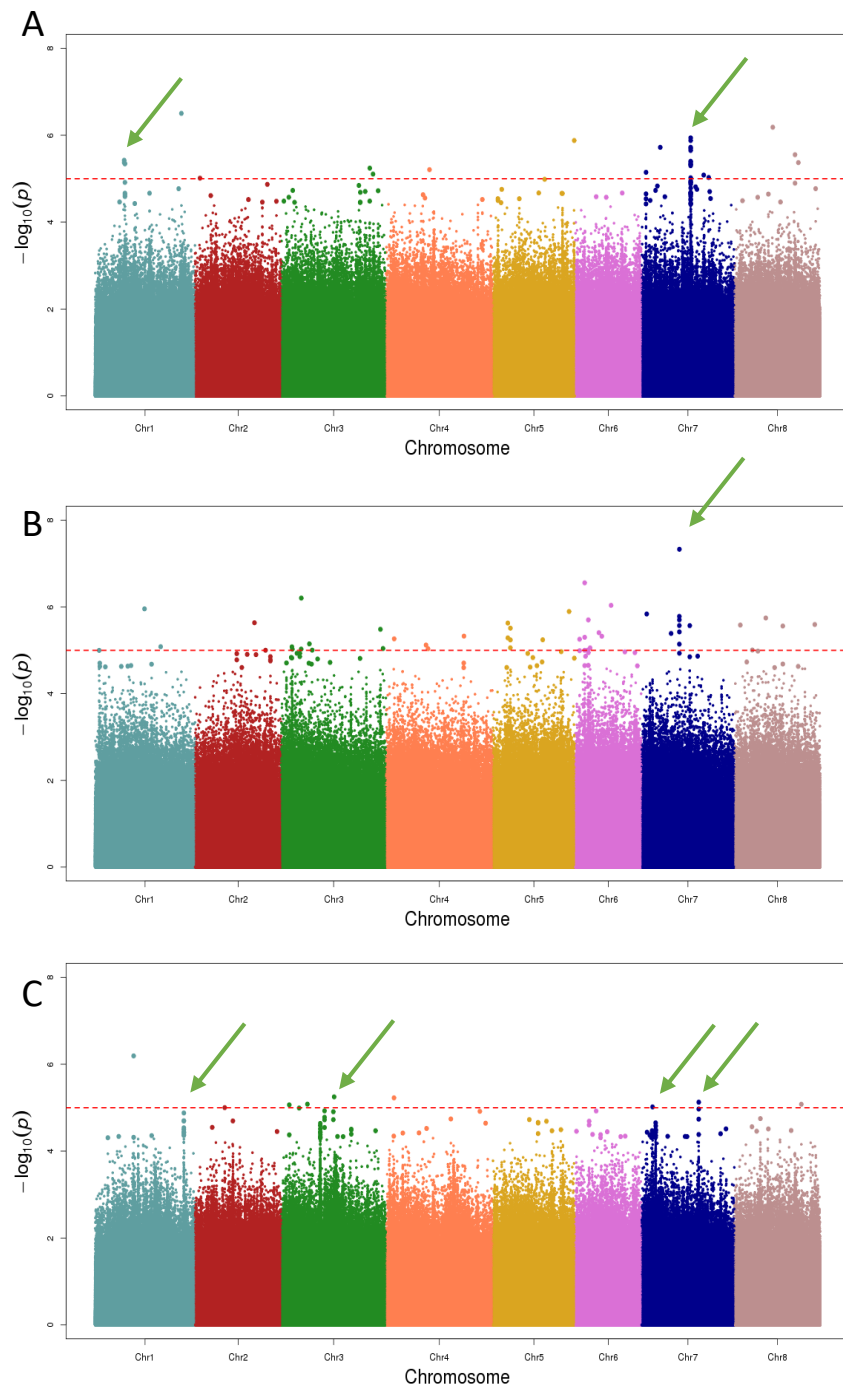


Figure C-10 : Manhattan plots obtenus suite à l'analyse de GWAS de la réponse à *Verticillium alfalfae* V31-2 au sein de l'espèce *Medicago truncatula*.

Les phénotypes AUDPC (A), xmid (B) et taux de réisolement (C) ont été évalués chez 246 accessions de la collection *MtHapMap*. L'analyse de génétique d'association a été réalisée selon un modèle linéaire mixte prenant en compte la structure de la population et l'apparentement entre individus.

L'axe horizontal représente la longueur des chromosomes. Chaque point représente la probabilité que le SNP soit lié au phénotype étudié. Les 100 SNPs les plus significatifs sont représentés par des points de plus grosse taille, la ligne rouge marque le seuil arbitraire de 5. Des QTLs différents (flèches vertes) sont obtenus pour les phénotypes d'AUDPC, du paramètre xmid et du taux de réisolement.

Le phénotype MSS et le paramètre Asym, décrivant la sévérité des symptômes foliaires, permettent de mettre en évidence les mêmes QTLs au niveau des chromosomes 1 et 7 que le phénotype AUDPC mais avec des *P-values* moins significatives (Annexe, **Figure F-2**, page 425). Un nouveau QTL sur le chromosome 7 est identifié avec le paramètre xmid qui ne colocalise pas avec ceux obtenus pour l'AUDPC, le MSS et le paramètre de modélisation Asym (**Figure C-10-B**). Ces premières analyses mettent en évidence le caractère polygénique de la résistance à *Va* V31-2 chez *Medicago truncatula* : i) le contrôle génétique d'un phénotype de maladie implique plusieurs QTLs, ii) la vitesse de progression de la maladie (caractérisée par le paramètre xmid qui correspond au temps nécessaire pour atteindre la moitié du score du symptôme maximal) n'est pas contrôlée par les mêmes mécanismes génétiques que la sévérité de la maladie.

Les résultats obtenus pour le taux de réisolement diffèrent de ceux obtenus pour les phénotypes et paramètres décrivant l'évolution des symptômes de flétrissement (AUDPC, MSS, Asym et xmid) : des pics apparaissent au niveau des chromosomes 1, 3 et 7 mais ils ne colocalisent pas avec les pics précédents et sont moins significatifs que les pics des phénotypes et paramètres d'évolution des symptômes de maladie (**Figure C-10-C**). Différents contrôles génétiques sont donc responsables de la progression de la maladie et de la colonisation des parties aériennes de *Medicago truncatula*. Des observations similaires ont déjà été faites chez d'autres pathosystèmes tels que *Arabidopsis thaliana* et *Verticillium longisporum* (Häffner *et al.*, 2010) ou encore *Pisum sativa* et *Aphanomyces euteiches* (Lavaud *et al.*, 2016).

b. Analyse détaillée des QTLs majeurs détectés par GWAS pour l'identification de gènes candidats

En utilisant le seuil arbitraire de 5, 113 gènes candidats ont été identifiés dans un rayon de 20 kb autour des SNPs significatifs. La suite de cette étude a été focalisée sur les pics du chromosome 1 et ceux du chromosome 7 identifiés avec les phénotypes AUDPC, MSS et les paramètres Asym et xmid. En effet, la présence de pics de SNPs (due au déséquilibre de liaison qui existe entre deux SNPs proches) dont les plus significatifs ont des scores allant respectivement de 5,94 à 7,33 pour les pics sur le chromosome 7 détectés pour l'AUDPC et xmid, nous a amené à penser que ces SNPs pouvaient être en LD avec la/les mutations causales.

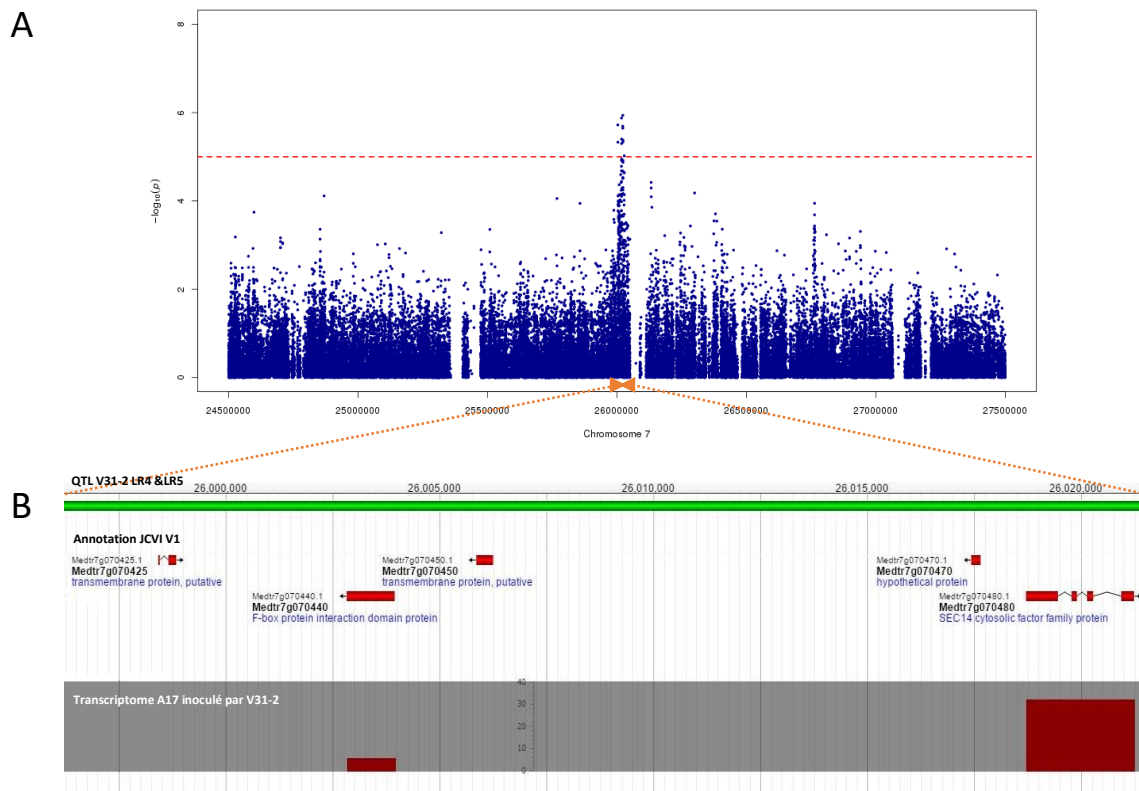


Figure C-11 : Position des gènes candidats à la résistance à *Verticillium alfalfae* V31-2 sur le pic du chromosome 7 détecté à partir des phénotypes AUDPC, MSS et Asym.

A. Zoom du Manhattan plot des résultats obtenus pour l'AUDPC pour le chromosome 7.

B. Visualisation de la position du QTL détecté grâce aux populations de RILs LR4 et LR5 (Ben *et al.*, 2013a), des gènes prédits et annotés sur la version v4.0 du génome de *Medicago truncatula* et de leur niveau d'expression dans un pool de racines de la lignée résistante *Medicago truncatula* A17 à 4, 8 et 24 heures après inoculation par *Va* V31-2.

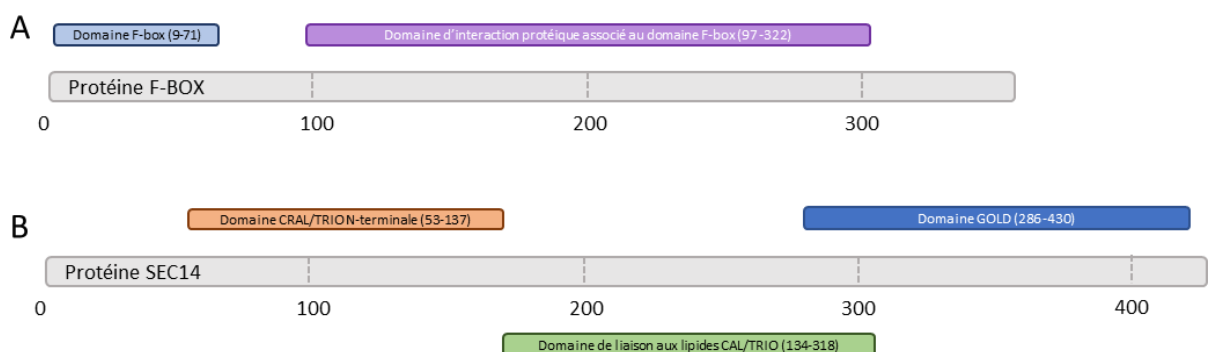


Figure C-12 : Domaines fonctionnels prédits pour la protéine F-BOX encodée par le gène Medtr7g070440 (A) et la protéine SEC14 encodée par le gène Medtr7g070480 (B).

Les rectangles gris représentent les séquences protéiques entières. La taille des domaines fonctionnels est indiquée entre parenthèse et ont été prédits avec l'outil en ligne InterPro (Finn *et al.*, 2017).

Pic principal du chromosome 7

Le pic du chromosome 7 identifié avec les phénotypes AUDPC, MSS et le paramètre Asym se situe entre 25 995 000 et 26 025 000 pb (**Figure C-11-A**). Il colocalise avec les QTLs de résistance à V31-2 identifiés dans les populations de RILs LR4 et LR5 (Ben *et al.*, 2013a). De plus, parmi les cinq gènes situés dans cette zone, Medtr7g070440 (codant pour une protéine F-box, chr7:26002830-26003951) et Medtr7g070480 (codant pour une protéine SEC14, chr7:26018713-26021238) sont les seuls exprimés dans un pool de racines de la lignée résistante *Medicago truncatula* A17 à 4, 8 et 24 heures après inoculation par *Va* V31-2 (Toueni *et al.*, 2016), **Figure C-11 B**). Le gène Medtr7g070440 code pour une protéine à domaine F-BOX d'une longueur de 313 acides aminés (**Figure C-12-A**). Ce domaine d'interaction protéine-protéine permet la formation des complexes SCFs (Skp1-cullin-F-BOX protein ligase), constituant une classe de ligases E3. Les protéines en interaction avec les F-BOX sont ensuite phosphorylées (généralement au niveau d'un résidu lysine) avant d'être dégradées (dégradation par la voie de l'ubiquitination). De part cette activité de dégradation des protéines, les protéines à domaine F-BOX jouent des rôles dans différents processus de régulation du développement des plantes et dans l'adaptation aux conditions environnementales (stress biotiques et abiotiques). En effet, les complexes SCF régulent les voies de signalisation de différentes phytohormones telles que l'acide jasmonique, la gibbérelline ou l'éthylène. Par exemple chez *Arabidopsis thaliana*, la voie de signalisation des gibbérellines est régulée par les protéines F-BOX SLEEPY1 et SNEEZY, la voie de signalisation de l'éthylène est contrôlée par EBF1 et EBF2 (Lechner *et al.*, 2006). Chez *Medicago truncatula*, le gène Medtr3g011020 est l'un des candidats à la résistance à *Aphanomyces euteiches* et code également pour une protéine F-BOX (Bonhomme *et al.*, 2013).

Le gène Medtr7g070480 code pour une protéine SEC14 qui a une longueur de 436 acides aminés (**Figure C-12-B**). Il s'agit d'une PITP (Phosphatidylinositol Transfer Protein), se caractérisant par le transfert de phosphatidylinositol ou de phosphatidylcholine entre deux couches d'une membrane cellulaire *in vitro*. Initialement identifiée chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, la protéine SEC14 joue un rôle dans le transport de protéines au sein de l'appareil de Golgi (Phillips *et al.*, 2006). La protéine codée par le gène Medtr7g070480 est constituée de deux domaines, le domaine CRAL-TRIO (domaine de liaison de petites molécules lipophiles) et le domaine GOLD (pour Golgi dynamics, domaine caractéristique de protéines de l'appareil de Golgi et des protéines lipidiques impliquées dans le trafic vésiculaire). L'association de ces domaines suggère que cette protéine SEC14 interagirait avec les membranes de l'appareil de Golgi. Chez *Arabidopsis thaliana*, les six protéines SEC14 possédant ces deux domaines sont aussi appelées patellins (PATL1 à PATL6). PATL1 jouerait un rôle lors de la méiose (Peterman *et al.*, 2004). PATL3 et PATL6 sont deux protéines qui interagissent avec la protéine de mouvement du virus de la mosaïque de la luzerne, en l'empêchant de progresser vers d'autres cellules par les plasmodesmes (Peiro *et al.*, 2014).

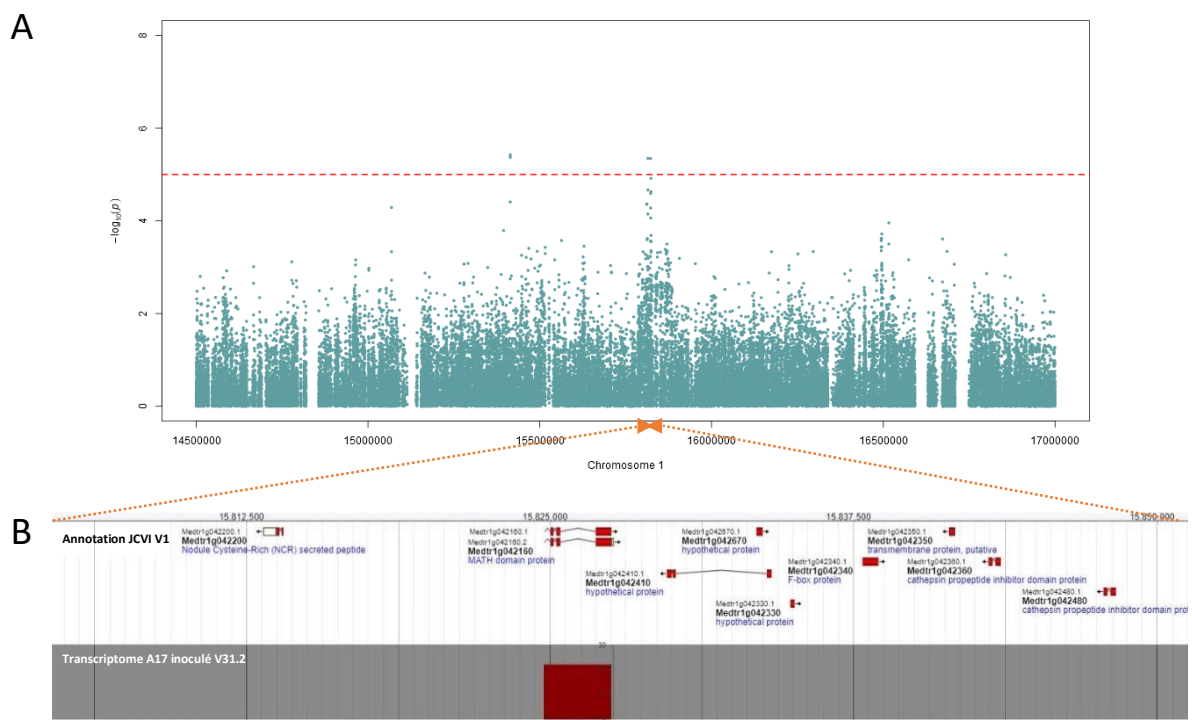


Figure C-13 : Position des gènes candidats à la résistance à *Verticillium alfalfae* V31-2 sur le pic du chromosome 1 détecté à partir des phénotypes AUDPC, MSS et Asym.
A. Zoom du Manhattan plot des résultats obtenus pour l'AUDPC pour le chromosome 1.
B. Visualisation des gènes prédits et annotés sur la version v4.0 du génome de *Medicago truncatula* et de leur niveau d'expression dans un pool de racines de la lignée résistante *Medicago truncatula* A17 à 4, 8 et 24 heures après inoculation par *Va* V31-2.



Figure C-14 : Domaine fonctionnel prédit pour la protéine MATH encodée par le gène Medtr1g042160.1.
Le rectangle gris représente la séquence protéique entière. La taille du domaine fonctionnel prédit avec l'outil en ligne interpro (Finn *et al.*, 2017) est indiquée entre parenthèse.

Pic du chromosome 1

Sous le QTL du chromosome 1 identifié avec les phénotypes AUDPC, MSS et le paramètre Asym et situé entre 15 810 000 et 15 840 000 pb (**Figure C-13-A**), Medtr1g042160.1 (chr1 : 15824709-15827639) annoté comme un gène codant pour une protéine à domaine MATH (meprin and Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAF-C) Homology) est le seul gène du pic exprimé dans un pool de racines de la lignée résistante *Medicago truncatula* A17 à 4, 8 et 24 heures après inoculation par *Va* V31-2 (Toueni *et al.*, 2016). Parmi les autres candidats gènes candidats non exprimés dans le pool de racines précédemment décrit, trois codent pour des protéines hypothétiques (Medtr1g042330, Medtr1g042410, Medtr1g042670), un gène code pour une protéine transmembranaire (Medtr1g042350), un gène code pour une protéine F-BOX (Medtr1g042340), un gène code pour des peptides de nodule riche en cystéine (Medtr1g042200, peptide anti-microbien de la plante hôte impliqué dans la mise en place de la symbiose), et deux gènes codent pour des inhibiteurs de cathépsine (Medtr1g042360, Medtr1g042480).

Le gène Medtr1g042160.1 code pour une protéine à domaine MATH d'une longueur de 309 acides aminés (**Figure C-14**). Le domaine MATH se caractérise par une couche de 7 à 8 hélices β anti-parallèles permettant des interactions protéines/protéines. Cette structure est conservée chez un grand nombre d'eucaryotes, et permet des interactions avec des protéines appartenant à toutes les familles impliquées dans la régulation protéique ou dans l'ubiquitination (Zapata *et al.*, 2007). Peu de connaissances sont disponibles sur les protéines constituées exclusivement des domaines MATH. Chez *Arabidopsis thaliana*, il a été montré que l'expression racinaire de la protéine à domaine MATH codée par At3g20370 était modifiée lors de son interaction avec le basidiomycète *Piriformospora indica* (Oelmüller *et al.*, 2005), un endophyte cultivable qui colonise les racines, et est utilisé comme modèle d'étude de l'interaction bénéfique entre plantes et microorganismes (son inoculation permet une augmentation de la croissance et de la biomasse végétale) (Varma *et al.*, 1999). La protéine à domaine MATH codée par At3g58350 restreint les mouvements longues distances de plusieurs potyvirus (Cosson *et al.*, 2010).

Second pic du chromosome 7

Le second pic du chromosome 7 identifié avec le paramètre xmid se situe entre 20 040 000 et 20 060 000 pb (**Figure C-15-A**). Il colocalise avec le QTL de résistance à V31-2 identifié dans la population de RILs LR5 (Ben *et al.*, 2013a). Au sein de cette région génomique, les gènes Medtr7g056490, Medtr7g056493 et Medtr7g056500 encodent de petits peptides LEED..PEEDs (motifs d'acide aminés conservés), le gène Medtr7g056503 une protéine F-BOX et Medtr7g056507 une protéine hypothétique. Les LEED..PEEDs sont des peptides exclusivement exprimés dans les nodules,

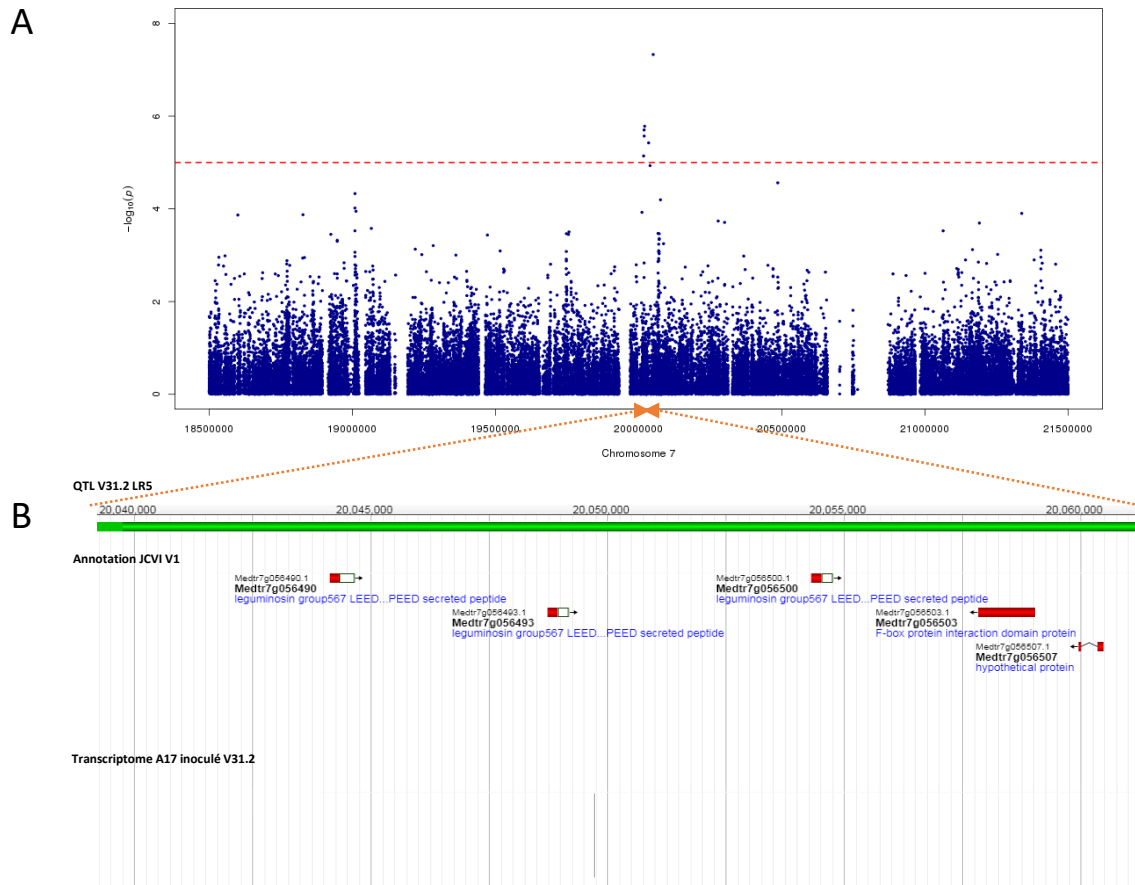


Figure C-15 : Position des gènes candidats à la résistance à *Verticillium alfalfae* V31-2 sur le pic du chromosome 7 détecté à partir du paramètre xmid.

A. Zoom du Manhattan plot des résultats obtenus pour xmid pour le chromosome 7.

B. Visualisation de la position du QTL détecté grâce à la population de RILs LR5 (Ben *et al.*, 2013b), des gènes prédits et annotés sur la version v4.0 du génome de *Medicago truncatula* et de leur niveau d'expression dans un pool de racines de la lignée résistante *Medicago truncatula* A17 à 4, 8 et 24 heures après inoculation par *Va* V31-2.

et à ce jour spécifiques au genre *Medicago* (ils sont absents des génomes de *Glycine max*, *Lotus japonicus*, *Trifolium pratense*, ou encore *Pisum sativum*). Le pic du chromosome 7 est inclus dans une fenêtre de 93 kb notamment constituée d'un cluster de gènes où se situe 12 des 13 gènes encodants les LEED..PEEDs chez *Medicago truncatula* A17 (Trujillo *et al.*, 2014). Toutefois, parmi ces cinq gènes situés sous le pic, aucun n'est exprimé dans un pool de racines de la lignée résistante *Medicago truncatula* A17 à 4, 8 et 24 heures après inoculation par *Va* V31-2 (Toueni *et al.*, 2016, **Figure C-15-B**). Deux hypothèses peuvent être émises : soit l'expression d'un de ces gènes candidats à la résistance à la verticilliose chez *Medicago truncatula* est plus tardive, soit il pourrait exister un micro ARN au niveau de ce pic, le SNP le plus significatif se situant à la position 20 050 636, entre les gènes Medtr7g056493 et Medtr7g056500.

Afin de maximiser les chances de validation fonctionnelle d'un gène candidat à la résistance *Verticillium alfalfae* chez *Medicago truncatula*, et étant donné que les gènes de ce pic ne sont pas exprimés dans les temps précoces après inoculation, ces gènes candidats n'ont pas été retenus dans la suite de cette étude.

c. Autres gènes candidats à la résistance à *Verticillium alfalfae* chez *Medicago truncatula* identifiés par l'analyse de GWAS

Phénotypes et paramètres de symptômes foliaires et de progression de la maladie

Outre les trois QTLs majeurs décrits précédemment, l'analyse de génétique d'association des phénotypes et paramètres d'évolution de la verticilliose chez *Medicago truncatula* permet de mettre en évidence d'autres gènes candidats présentés dans le **Tableau F-5** en annexe page 421. Parmi cette liste exhaustive, seront discutés ici les candidats les plus prometteurs de par leur fonction prédite, leur expression racinaire chez la lignée résistante A17 à des temps précoces après inoculation par *Va* V31-2 (tel que décrit par Toueni *et al.*, 2016) et, le cas échéant, leur colocalisation avec des QTL de résistance à la verticilliose précédemment mis en évidence par l'analyse de population de RILs.

Ainsi, pour les phénotypes AUDPC, MSS et Asym, le SNP significatif isolé du chromosome 1 (**Figure C-10-A** et Annexe **Figure F-2** page 425) est localisé en amont du gène Medtr1g101310 (10 kb) codant pour une protéine inactive rhomboid-like qui est exprimé dans un pool de racines de la lignée résistante A17 à 4, 8 et 24 heures après inoculation par *Va* V31-2 (Toueni *et al.*, 2016). De plus, ce gène candidat colocalise avec un QTL de résistance à *Verticillium non-alfalfae* LPP0323 chez *Medicago truncatula* (Negahi *et al.*, 2014). Les rhomboïdes sont des protéases intramembranaires impliquées dans diverses fonctions biologiques telles que les voies de signalisation, le développement, l'apoptose, l'intégrité mitochondriale ou encore l'invasion par des parasites. Peu de ces protéines rhomboïdes ont

été décrites chez les plantes, et aucune d'entre elles ne fait partie de la classe des protéines rhomboïdes inactives (Knopf and Adam, 2012). Néanmoins, chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*), des protéines rhomboïdes inactives du réticulum endoplasmique inhibent les protéines rhomboïdes de l'appareil de Golgi régulatrices des récepteurs du facteur de croissance épidermique, permettant ainsi la régulation du sommeil (Zettl *et al.*, 2011; Adrain and Freeman, 2012). Malgré l'inactivité de la fonction protéase de ces protéines rhomboïdes, elles interviennent indirectement sur la dégradation des protéines : le gène Medtr1g101310 paraît être un bon candidat à la résistance *Verticillium alfalfae* chez *Medicago truncatula* et est d'autant plus intéressant puisque la fonction de ce type de gène n'a pas encore été décrite chez les plantes.

Sur le chromosome 5 pour le phénotype AUDPC (**Figure C-10-A**), le SNP le plus significatif se trouve en amont du gène Medtr5g098680 (1,8 kb) codant pour une protéine ligase E3 ubiquitine orthrus-like, et est exprimé dans un pool de racines de la lignée résistante A17 à 4, 8 et 24 heures après inoculation par *Va* V31-2 (Toueni *et al.*, 2016). Comme pour les F-BOX, cette famille de protéine intervient dans la voie de dégradation des protéines (Lechner *et al.*, 2006).

Sur le chromosome 6, pour le paramètre de modélisation xmid (**Figure C-10-B**), les SNPs les plus significatifs se situent entre les deux gènes Medtr6g015430 et Medtr6g015435 encodant des protéines de résistance à la maladie à domaine TIR-NBS-LRR, ainsi qu'en amont du gène Medtr6g018400 codant pour une protéine F-BOX SKIP23-like. Ces trois gènes sont également exprimés dans un pool de racines d' A17 à 4, 8 et 24 heures après inoculation par *Va* V31-2 (Toueni *et al.*, 2016).

Sur le chromosome 8 pour les phénotypes AUDPC, MSS et Asym (**Figure C-10-A** et Annexe **Figure F-2** page 425), le SNP le plus significatif est localisé en amont du gène Medtr8g079360 (4,5 kb) encodant une protéine de résistance à la maladie à domaines LRR et NB-ARC. Pour le paramètre de modélisation xmid, un des SNPs les plus significatifs se trouve en amont du gène Medtr8g027150 (0,2 kb) encodant une protéine PPR (Pentatricopeptide Repeat). Il s'agit de protéines régulant l'expression des gènes au niveau des ARNs notamment au niveau des organites cellulaires : elles jouent des rôles au niveau de la transcription, l'épissage, la stabilité, l'édition et la traduction des ARNs (Manna, 2015). Par exemple, lors de l'inoculation d'*Arabidopsis thaliana* par des souches du pathogène foliaire *Pseudomonas syringae* produisant l'effecteur AvrRpt2 (tel que *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000), le siARN nat-siRNAATGB2 contribue à la mise en place de la résistance à RPS2 en inhibant PPRL, une protéine PPR mitochondriale. Les auteurs de cette étude ont émis l'hypothèse que cette PPR pouvait réguler la production de radicaux libres (ROS), la réponse hypersensible ou l'apoptose au sein des mitochondries (Katiyar-Agarwal *et al.*, 2006). Plus récemment, l'implication de PGN, une autre PPR mitochondriale d'*Arabidopsis thaliana* dans la réponse au stress abiotique (stress salin) et dans la réponse aux champignons nécrotrophiques *Botrytis cinerea* BO5-10 et *Alternaria brassicicola* MUCL20297 a été montrée en utilisant des mutants KO (Laluk *et al.*, 2011). Les gènes Medtr8g079360 et Medtr8g027150

sont aussi exprimés dans le pool de racines d' A17 à des temps précoces (<24 heures) après inoculation par *Va* V31-2 (Toueni *et al.*, 2016).

Phénotype de colonisation des parties aériennes par *Va* V31-2

L'analyse de génétique d'association effectuée sur le taux de réisolement du champignon dans les parties aériennes de *Medicago truncatula* a mis en valeur des pics de SNPs sur les chromosomes 1, 3 et 7. En gardant le seuil de significativité de 5, le gène Medtr3g062140 (10 kb) codant pour une protéine de résistance à la maladie à domaines LRR et NB-ARC se trouve en aval du pic du chromosome 3. Sur le chromosome 7, le SNP le plus significatif se trouve dans l'exon 3 du gène Medtr7g018130 codant une protéine de la famille des tyrosines-kinases. Ces enzymes ont la capacité de transférer un groupement phosphate d'un ATP vers une tyrosine protéique permettant ainsi généralement la transduction de signaux comme par exemple lors de la perception de la flagelline bactérienne chez *Arabidopsis thaliana* (Lin *et al.*, 2014). Ces deux gènes sont également exprimés dans un pool de racines de *Medicago truncatula* A17 à 4, 8 et 24 heures après inoculation par *Va* V31.2.

L'implication des gènes candidats codant les protéines F-BOX, SEC14 et MATH dans des résistances à des pathogènes chez *Medicago truncatula* n'a pas encore été décrite. Dans le cadre de cette thèse, compte tenu du temps imparti et de la lourdeur des expériences de validation fonctionnelle, il a été choisi de se focaliser sur l'étude des deux gènes candidats Medtr7g070440 (F-BOX) et Medtr7g070480 (SEC14). Ceux-ci, localisés sous le pic principal du chromosome 7 détecté par l'analyse de GWAS de trois phénotypes de maladie parmi lesquels les paramètres MSS et Asym décrivant la sévérité des symptômes foliaires et sous les QTLs identifiés à partir des populations de RILs LR4 et LR5, pourraient constituer des déterminants génétiques clés de la résistance à la verticilliose. Le(s) gène(s) candidats situés sous les autres QTL mis en évidence au cours de cette étude, et notamment ceux sous le QTL du chromosome 7 identifié avec le phénotype xmid potentiellement impliqué dans la vitesse de déclenchement de la maladie, pourront faire l'objet d'études fonctionnelles ultérieures.

Tableau B-1 : Génotypes des lignées RILs des populations LR4 et LR5 en génération F5 au niveau du QTL majeur de résistance à *Verticillium alfalfae* V31-2 du chromosome 7.

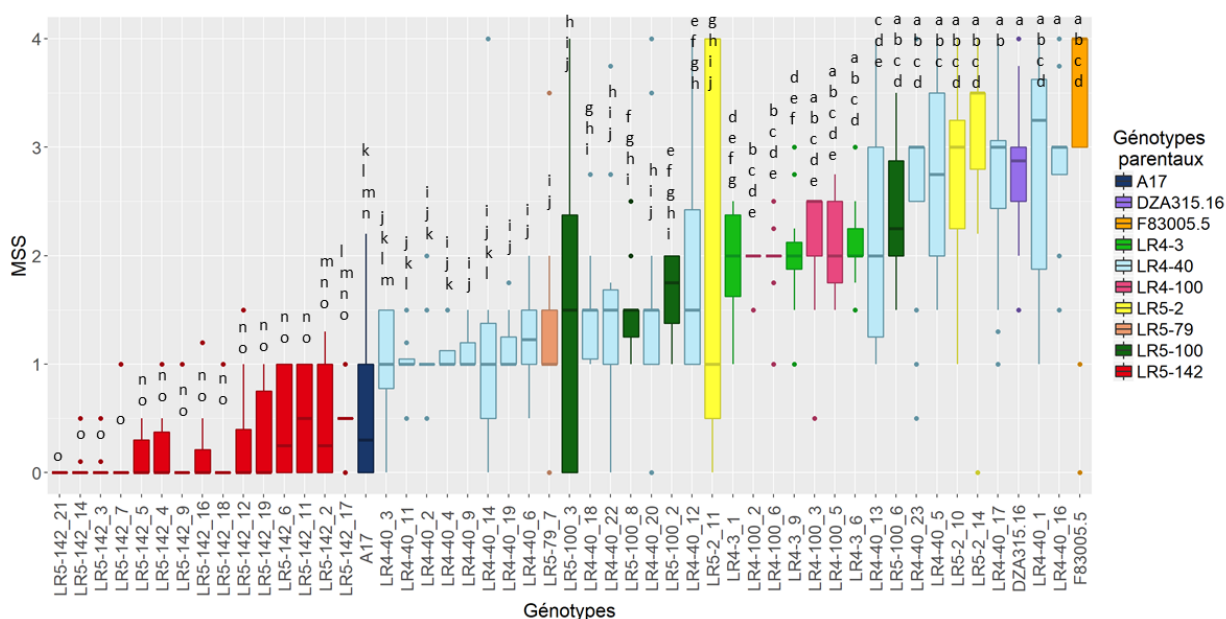
Par convention à un marqueur donné, le génotype de la lignée est noté A lorsqu'il est identique à celui du parent femelle (A17 dans les deux croisements), B lorsqu'il est identique à celui du parent mâle (DZA315.16 pour LR4 et F83005.5 pour LR5). H correspond au génotype hétérozygote. Les marqueurs flanquant les QTLs de résistance à *Va* V31-2 sont symbolisés par le cadre noir. Le LOD score (Logarithm of Odds) est utilisé pour estimer le degré d'association entre un le génotype à marqueur génétique et la résistance à *Va* V13-2. Interval correspond à la distance en cM entre deux marqueurs génétiques consécutifs, cumulated est la distance en cM séparant le premier marqueur du groupe de liaison du marqueur considéré.

LR5 : A17 [R] x F83005.5 [S]

Marqueurs	mtic226 chr7:19506076 - 19506204	MTE73 chr7:19917489 - 19917608	MTE85 chr7:25707895 - 25708075	MTE126 chr7:29064667 - 29064788	mtic719 chr7:31144656 - 31144775
Interval (cM)	8,8	10,9	7,8	3,9	2,1
Cumulated (cM)	42,6	51,4	62,3	70,1	74
LOD	18,1	16,3	21,8	31,8	35,9
RIL #					
2	B	B	H	-	B
39	B	H	B	B	B
79	A	H	H	B	B
100	H	A	H	A	H
142	H	H	H	A	A

LR4 : A17 [R] x DZA315.16 [S]

Marqueurs	mtic108 chr7:23424121 - 23424232	mtic273 chr7:23870434 - 23870549	MTE70 chr7:27826406 - 27826511	MTE126 chr7:29064667 - 29064788	mtic246 chr7:29503509 - 29503625
Interval (cM)	3,6	20,6	3,8	0,8	3,4
Cumulated (cM)	51,2	54,8	75,4	79,2	80
LOD	18,4	12,5	23,2	21,2	14,1
RIL #					
3	A	A	H	H	H
40	B	H	H	H	H
100	B	B	H	H	H

**Figure C-16 : Diagramme en boîte à moustaches des scores maximum de symptômes (MSS) des HIFs LR4 et LR5 issues de RILs présentant de l'hétérozygotie résiduelle sous le QTL majeur du chromosome 7.**

Les moyennes et les erreurs standards à la moyenne sont représentées. Les lettres représentent les groupes de moyennes obtenus par le test de Conover et Iman.

d. Validation génétique du QTL majeur situé sur le chromosome 7 par analyse de HIFs.

Le QTL majeur du chromosome 7 identifié par GWAS colocalisant avec les QTLs de résistance à *Va* V31-2 identifiés chez les populations de RILs LR4 et LR5, l'obtention et l'analyse de HIFs (Heterogeneous Inbred Families) ont été envisagées pour réduire l'intervalle de confiance du QTL par une approche génétique et tenter de cloner positionnellement le(s) gène(s) sous-jacent(s) responsable(s) de la résistance à la verticilliose. Pour cela, les lignées LR5-2, LR5-39, LR5-79, LR5-100, LR5-142, LR4-3, LR4-40, et LR4-100 hétérozygotes sous les QTLs en génération F5 (**Tableau B-1**) ont été autofécondées durant l'hiver 2014-2015. De 8 à 33 plantes ont été cultivées pour chacune de ces lignées de telle sorte à obtenir pour chacune des lignées des individus ségrégeants pour la résistance à *Verticillium alfalfae* V31-2. Malheureusement, un semi tardif couplé à un printemps chaud n'ont pas permis d'obtenir de gousses ou un nombre de gousses suffisant pour l'ensemble des individus autofécondés (**Tableau F-6** page 427). La réponse à *Verticillium alfalfae* V31-2 de la descendance des individus ayant produit plus de 10 gousses a été évaluée en deux répétitions indépendantes selon le même protocole que celui utilisé pour évaluer les collections d'accessions naturelles du MtHapMap et de la population tunisienne Soliman. L'évolution des symptômes de flétrissement foliaire a été décrite selon les deux paramètres de maladie MSS et AUDPC. Le coefficient de corrélation des rangs Tau de Kendall entre ces deux phénotypes est de 0,76. Il existe des différences significatives du niveau de sensibilité à *Va* V31-2 au sein des lignées étudiées (**Figure C-16**). Ainsi, l'ANOVA sur les rangs (ou test de Kruskal-Wallis) sur le MSS met en évidence un effet significatif du génotype ($P\text{-value} < 2,2.e^{-16}$) et de la répétition ($P\text{-value} = 2,82.e^{-4}$). Certaines de ces lignées telles que les RILs dérivées de la RIL LR4-40 montrent une ségrégation dans le niveau de résistance à *Va* V31-2, les lignées LR4-40_3, _11, _2, _4, _9, _14, _19, _6, _18, _22, et _20, étant significativement plus résistante que les lignées LR4-40_16, _1, _17, _5 et _13. Le génome de la lignée LR4-40 devait donc encore être à l'état hétérozygote au gène de résistance à *Va* V31-2 qui serait donc situé à droite du marqueur mtic108. Dans la descendance en ségrégation, la lignée LR4-40_3 a sûrement été fixée avec l'allèle A du parent résistant A17 dans la région du gène alors que les lignées LR4-40_16, _1, _17, _5 et _13 ont sûrement été fixées avec l'allèle B du parent sensible DZA315.16 au niveau du gène. Ceci reste à vérifier par génotypage des différentes RILs avec les marqueurs microsatellites cartographiés dans la zone (**Tableau B-1**).

Par ailleurs, aucune ségrégation dans la sensibilité à *Va* V31-2 n'est observable au sein des lignées issues de la RIL LR5-142 qui sont toutes résistantes à cette souche et appartiennent toutes au même groupe de moyennes de MSS. Ceci tend à montrer que le génome de ces lignées est fixé pour le gène conférant la résistance à la verticilliose et porte l'allèle A du parent résistant A17. Ce gène est donc situé à droite du marqueur MTE85. Certains descendants de la HIF LR5-142 sembleraient montrer un phénotype transgressif de résistance par rapport au parent A17. Ainsi, elle pourrait cumuler dans leur

génomique des allèles favorables à la résistance provenant des deux parents A17 (résistant) et F83005.5 (sensible).

Enfin, certaines RILs telles que LR5-2_11 et LR5-100_3 montrent une grande variabilité du niveau de sensibilité parmi les plantes phénotypées. Une telle ségrégation dans la descendance de ces deux lignées pourrait signer le fait qu'elles soient encore hétérozygotes au niveau du gène de résistance à *Va* V31-2 ce qui localiserait ce gène à droite du marqueur MTE73 et à gauche du marqueur mtic 719 pour la RIL LR5-2 et entre MTE73 et MTE126 pour la RIL LR5-100. Ceci reste à confirmer par le génotypage à ces marqueurs des lignées LR5-2_11 et LR5-100_3 et de leurs descendance qui ont été phénotypées.

Si l'ensemble des hypothèses émises sur la base des données de phénotypage des descendance des HIFs sont confirmées par le génotypage de ces individus qui sera réalisé prochainement, cela permettrait de réduire l'intervalle de confiance du QTL entre les marqueurs MTE85 et MTE126. Cette position est en accord avec la localisation des deux principaux gènes candidats sous le QTL du chromosome 7, Medtr7g070440 (F-BOX) et Medtr7g070480 (SEC14), identifiés par l'analyse GWAS.

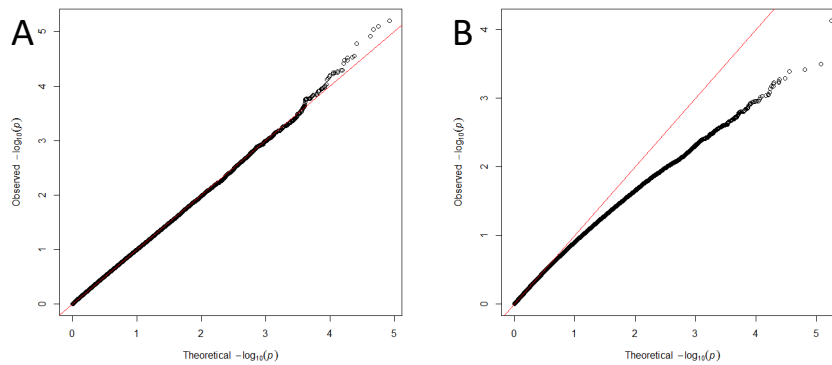


Figure C-17 : Q-Q plots des analyses réalisées sur l’AUDPC avec les modèles GLM (A) et MLM (B).
Chaque point représente pour un SNP la valeur observée de la P -value en fonction de sa valeur théorique : plus les points suivent la bissectrice représentée en rouge et plus le modèle est performant.

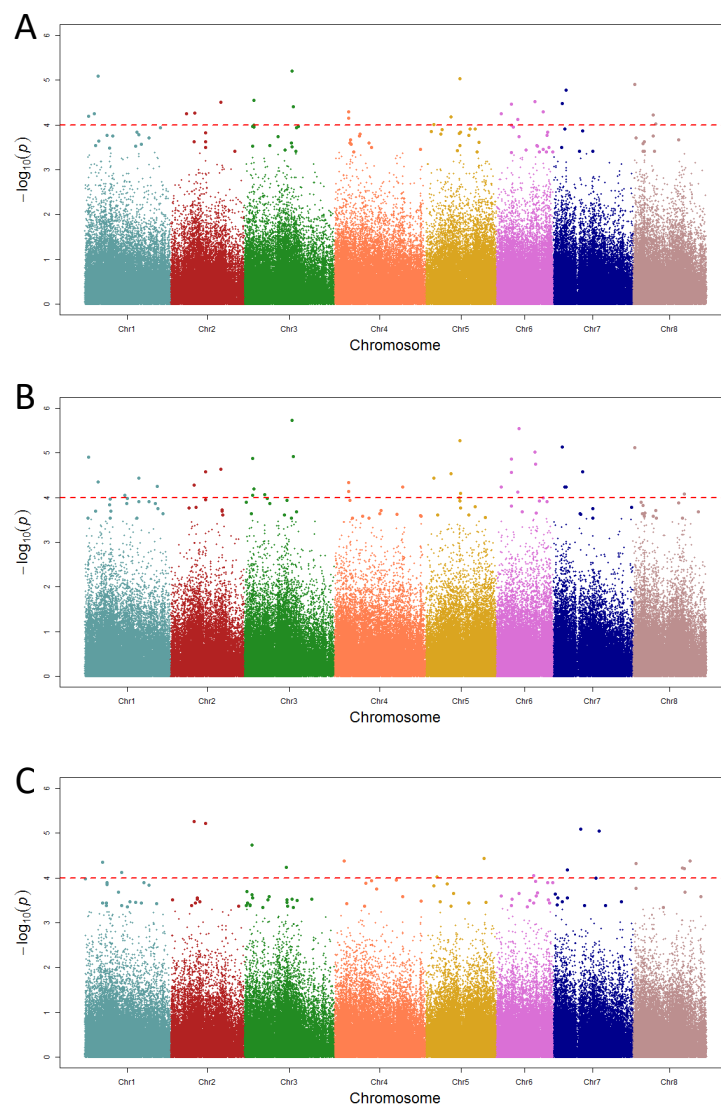


Figure C-18 : Manhattan plots obtenus pour les phénotypes AUDPC (A), MSS (B) et taux de réisolement (C) selon le modèle GLM.

L’axe horizontal représente la longueur des chromosomes. Chaque point représente la probabilité que le SNP soit lié au phénotype étudié. Les 100 SNPs les plus significatifs sont représentés par des points de plus grosse taille, la ligne rouge marque le seuil arbitraire de 4.

2. Analyse de GWAS pour la résistance à la verticilliose au sein de la population tunisienne Soliman de *Medicago truncatula* et identification de gènes candidats

Pour identifier des gènes candidats à la résistance à *Verticillium alfalfae* V31-2 au sein de la population Soliman, des modèles GLM incluant la structure de la population et MLM incluant la structure de population et l'apparentement entre accessions ont été testés sur les phénotypes AUDPC, MSS et taux de réisolement.

La **Figure C-17-A et B** représente les Q-Qplots obtenus pour chacun des deux modèles. En théorie, l'ensemble des *P-values* doivent suivre une loi uniforme à l'exception de la queue de distribution qui représente les *P-values* significatives obtenues pour le phénotype d'intérêt. Dans le cas du modèle MLM (B), il y a une déviation des *P-values* obtenues par rapport aux *P-values* attendues : ce modèle les sous-estime, il n'est donc pas le plus adapté à cette analyse. Pour le modèle GLM (A), l'allure du Q-Qplot est plus satisfaisante, seule la queue de distribution des résidus dévie des valeurs attendues. La suite de l'analyse a donc été conduite en utilisant le modèle GLM.

Les Manhattan plots obtenus pour les phénotypes AUDPC, MSS et taux de réisolement sont présentés **Figure C-18-A, B et C**. Comme pour l'étude menée sur la collection *MtHapMap*, les résultats obtenus avec les phénotypes AUDPC et MSS sont très ressemblants alors que les SNPs les plus significatifs obtenus pour le taux de réisolement sont différents : ceci confirme l'hypothèse selon laquelle l'évolution des symptômes foliaires et la colonisation des parties aériennes par *Verticillium* seraient contrôlées par des mécanismes génétiques différents. Cependant, contrairement à l'analyse précédente, on ne distingue ni pics ni massifs de SNPs significatifs pour nos phénotypes. Ceci peut s'expliquer par une plus faible densité de SNPs sur les individus de la population Soliman par rapport à ceux du *MtHapMap* (235 382 contre 5 671 743). Le seuil de significativité de Bonferroni s'élève à 6,67, aucun SNP n'atteint ce score dans cette étude : le meilleur SNP (chr3 :29404325) atteint un score de 5,73 pour le phénotype MSS. Le **Tableau F-7** page 429 récapitule, pour chaque phénotype et par chromosome, les gènes candidats localisés dans une région de 10 kb autour des SNPs avec un score dépassant un seuil arbitraire de 4. La colocalisation de ces gènes sous un QTL de résistance à *Verticillium* sp. (tels que précédemment décrits par Ben *et al.* (2013b) et Negahi *et al.* (2014)) ainsi que l'expression de ces gènes dans un pool de racines de *Medicago truncatula* moins de 24 heures après inoculation par *Verticillium alfalfae* V31-2 (Toueni *et al.*, 2016) sont également précisées dans ce tableau. Néanmoins, la distance moyenne entre deux SNPs étant de 1852 bp, et le déséquilibre de liaison s'élevant à 10 kbp, il est possible que certains SNPs candidats intra-géniques soient localisés dans le mauvais gène candidat à la résistance à la verticilliose. Au total, 57 gènes candidats ont été identifiés. Certains de ces gènes pourraient être de bons candidats, tels que Medtr2g073640 et Medtr2g073650, gènes codant pour des récepteurs kinases riches en leucine, Medtr1g056370 gène

C. RÉSULTATS

codant pour une protéine de réponse à la maladie ou encore Medtr3g065180, gène codant pour une protéine à doigt de zinc de type C3HC4. Le rôle de ce type de protéine dans la résistance aux pathogènes chez *Oryza sativa* ou *Brassica napa* a été validé : OsRHC24 et OsRHC1 confèrent une résistance à *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* et BrRZFP1 provoque une résistance accrue aux bactéries *Pectobacterium carotovorum* et *Ralstonia solanacearum* (Wang *et al.*, 2007b; Jung *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2014).

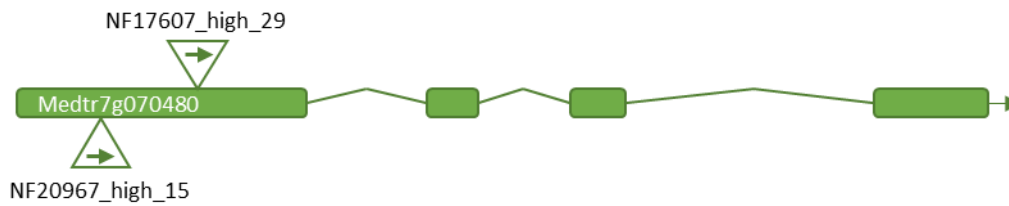


Figure C-19 : Positions des rétrotransposons *Tnt1* au sein du gène Medtr7g070280 des lignées mutantes NF17601 et NF20967.

La séquence codante du gène Medtr7g070280 (chr7: 25934408..25940277) est représentée par les rectangles, les lignes correspondent aux introns. Les triangles se situent au niveau des sites d'insertion du rétrotransposon (respectivement à 492 bp et 259 bp du début du gène pour NF17601 et NF20957), les flèches indiquent le sens de l'insertion (sens de l'insertion identifié par nos soins).

Tableau C-5 : Résultats de génotypage des lignées NF17601 et NF20967.

Parents	Individus	Amorces sens et anti-sens gène spécifique	Amorces Tnt1 + gène spécifique*	Génotypes
NF17607_R1	1	N	O	Homozygote mutant
NF17607_R1	2	N	O	Homozygote mutant
NF17607_R1	3	O	O	Hémizygote
NF17607_R1	4	O	O	Hémizygote
NF17607_R1	5	O	N	Homozygote sauvage
NF17607_R1	6	O	N	Homozygote sauvage
NF17607_R1	7	N	O	Homozygote mutant
NF20967_R0	1	N	O	Homozygote mutant
NF20967_R0	2	O	O	Hémizygote
NF20967_R0	3	O	O	Hémizygote
NF20967_R0	4	O	O	Hémizygote
NF20967_R0	5	O	O	Hémizygote
NF20967_R0	6	N	O	Homozygote mutant

*Pour les lignées NF17607 et NF20967 contenant une insertion sens du rétrotransposon, la détection du rétrotransposon *Tnt1* est effectuée avec l'amorce sens gène spécifique et l'amorce anti-sens *Tnt1* tel qu'indiqué Figure B-16 page 188.

N: Aucune amplification du produit PCR, O: Amplification du produit PCR.

III. Validation fonctionnelle des gènes candidats à la verticilliose chez *Medicago truncatula* par différentes approches

1. Recherche de mutants de *Medicago truncatula* dans les gènes d'intérêt

Dès l'identification des gènes candidats à la résistance à *Verticillium alfalfae* V31-2 Medtr1g042160.1 (encodant une protéine à domaine MATH), Medtr7g070440 (encodant une protéine F-BOX) et Medtr7g070480 (encodant une protéine SEC14), des mutants d'insertion *Tnt1* ont été recherchés dans la collection de The Noble Foundation (<https://medicago-mutant.noble.org/mutant/>). Cette collection de mutants d'insertion *Tnt1* a été préférée à la collection de mutants TILLING (obtenus par mutagenèse chimique à l'EMS). En effet, cette dernière se caractérise par un grand nombre de mutations par plante ne ciblant pas préférentiellement les régions intragéniques du génome contrairement à l'insertion *Tnt1* et permet l'apparition de séries alléliques ne conduisant pas nécessairement à une perte de fonction du gène muté (Le Signor *et al.*, 2009). Or, le contrôle génétique de la résistance à la verticilliose chez *Medicago truncatula* étant quantitatif, il est préférable d'utiliser des mutants knockout dans les gènes candidats à la résistance afin de maximiser les chances d'observer des différences significatives de phénotypes entre les plantes homozygotes mutantes et les plantes soeurs homozygotes sauvages (ou wild type siblings, plantes issues du même parent R0 mais possédant deux copies de l'allèle sauvage du gène candidat fonctionnel). Aucun mutant n'avait été identifié pour chacun des trois gènes candidats.

Néanmoins, la caractérisation des mutants de la collection de The Noble Foundation est toujours en cours et leur base de données est régulièrement mise à jour : deux lignées mutantes NF17607 et NF20967 dans le gène Medtr7g070480 codant pour la protéine SEC14 ont été commandées à l'automne 2016 et multipliées en serre. Elles ont été autofécondées dans nos serres : 7 plantes pour NF17607 (dont une morte avant production de descendance) en génération R1 (population en ségrégation, en théorie, un quart des individus sont homozygotes sauvages, un quart des individus sont homozygotes mutants et la moitié sont hémizygotes) et 6 plantes pour NF20967 en génération R0, et donc hémizygotes (**Tableau B-3** page 137, **Figure B-16** page 188 et **Figure C-19**). Aucun mutant n'a pu être identifié pour les deux autres gènes candidats à la résistance à *Verticillium alfalfae* V31-2.

Le **Tableau C-5** regroupe les premiers résultats de génotypage. Ces premiers résultats semblent cohérents pour la lignée NF17607 : il s'agit d'une génération R1, une ségrégation de la descendance suivant les lois de Mendel est attendue et obtenue (*P-value* de 0,48 pour le test du χ^2 avec permutations de Monte-Carlo compte-tenu de l'effectif faible). En revanche, il est anormal de trouver des mutants dans le gène Medtr7g070480 codant pour une protéine SEC14 dans la descendance de la lignée R0 NF20967 qui devrait être toute hémizygote. A l'heure actuelle, je n'explique pas la présence de ces mutants au sein de cette lignée.

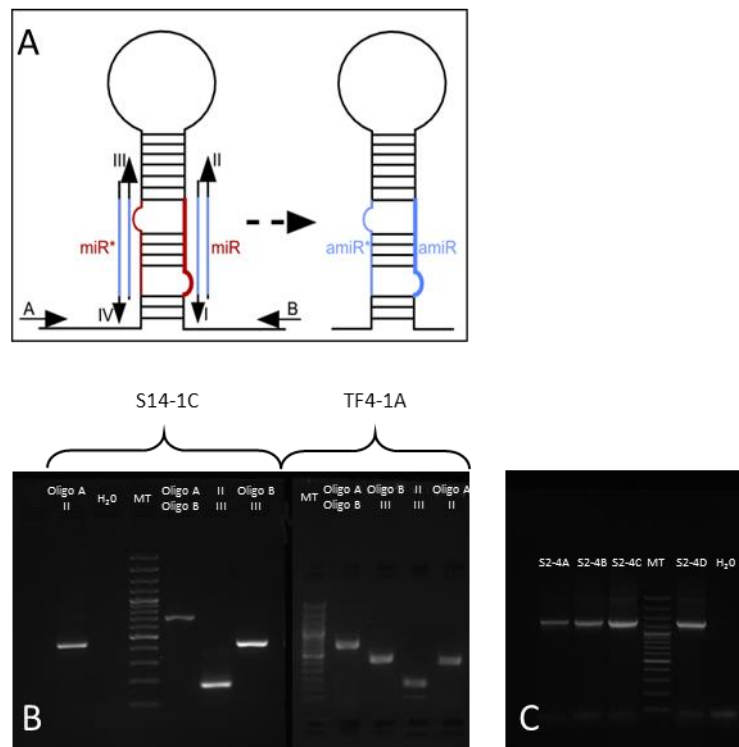


Figure C-20 : Vérification par PCR de l'intégrité des inserts après insertion dans *Agrobacterium rhizogenes* ARqua1 pour la validation fonctionnelle des gènes Medtr7g070440 et Medtr7g070480.

A. Visualisation de la position des amorces nécessaires à la synthèse de l'amiR. En rouge, la séquence spécifique du miR319a, les flèches bleues représentent les amorces et en bleu la séquence de l'amiR (adapté de Schwab, 2005).

B. Vérification du clone amiR S14-1C ciblant le gène Medtr7g070480 et du clone TF4-1A ciblant le gène Medtr7g070440. Les produits PCR sont obtenus avec les différents couples d'amorces utilisés lors du clonage (Oligo A/II : 425 bp, Oligo A/Oligo B : 701 bp, II/III : 176 bp, Oligo B/III : 452 bp).

C. Vérification des clones de surexpression S2-4A à S2-4D. Le produit PCR obtenu a une taille de 1318 bp.

La réponse des lignées homozygotes mutées et des wild type sblings dérivées du mutant NF17607_R1 à l'inoculation par *Va* V31-2 va être prochainement analysée au laboratoire. Le génotype des plantes phénotypées sera vérifié afin de valider les génotypes homozygotes des plantes mères. Les descendants hémizygotes du mutant NF20967_R0 sont actuellement en serre pour multiplication. La ségrégation pour la mutation sera analysée pour les six descendants afin d'identifier les homozygotes mutés et sauvages à phénotyper en réponse à *Verticillium alfalfae* V31-2.

2. Validation fonctionnelle sur plantes entières aux racines transgéniques

a. Obtention des vecteurs pour la transformation génétique racinaire

Afin de valider le rôle dans la résistance à *Verticillium alfalfae* V31-2 chez *Medicago truncatula* des deux gènes candidats du chromosome 7 codant pour une protéine F-BOX et une protéine SEC14, leur expression racinaire a été modifiée. Ainsi, pour éteindre l'expression des gènes, des microARNs artificiels (amiRs) ont été utilisés. Ces amiRs ont été choisis de façon à cibler spécifiquement nos gènes candidats qui appartiennent tous deux à des familles multigéniques (*cf.* Matériel et Méthodes page 175). L'expression des amiRs au sein des cellules végétales après transformation génétique des plantes est assurée par la présence d'un promoteur constitutif 35S du virus de la mosaïque du chou. Les amiRs provoquent une réduction de l'expression des gènes candidats grâce à leur hybridation aux ARNm de ces gènes et parfois grâce au clivage de ces ARNm. Pour surexprimer les gènes candidats, les ADNc de l'accession résistante A17 ont été clonés et exprimés dans les racines des lignées A17, F83005.5 et SA03780 grâce au même promoteur 35S. L'ensemble des inserts (amiR ou ADNc) a été cloné dans le plasmide pH7WG2 (Karimi *et al.*, 2002).

amiR ciblant les gènes Medtr7g070440 (F-BOX) et Medtr7g070480 (SEC14)

Avant d'effectuer la transformation transgénique racinaire de *Medicago truncatula*, l'intégrité des amiRs a été vérifiée par PCR et par séquençage Sanger. La **Figure C-20-B** présente les résultats PCR obtenus pour les clones d'*Agrobacterium rhizogenes* ARqua1 S14-1C (amiR ciblant le gène Medtr7g070480 codant pour la protéine SEC14) et le clone TF4-1A (amiR ciblant le gène Medtr7g070440 codant pour la protéine F-BOX). Comme attendu, la taille des amiRs entiers amplifiés avec les oligos A et B est bien de 701 bp et leur séquence est conforme à celle qui avait été choisie. Ces clones ont ensuite été sélectionnés pour réaliser les transformations génétiques racinaires.

ADNc d'A17 des gènes Medtr7g070440 (F-BOX) et Medtr7g070480 (SEC14)

Les ADNc des gènes Medtr7g070440 et Medtr7g070480 ont respectivement pour taille 1122 bp et 1318 bp. Malheureusement, l'ADNc d'A17 du gène Medtr7g070440 codant pour la protéine F-BOX n'a pas pu être cloné, ceci peut s'expliquer par un écart de température de fusion trop important entre les amorces sens et anti-sens (2,5°C). Étant donné que nous disposions déjà de résultats encourageants sur le candidat Medtr7g070480, le clonage du gène Medtr7g070440 n'a pas été poursuivi. L'ADNc du Medtr7g070480 codant pour la protéine SEC14 a été cloné et le clone S2-4A sélectionné (**Figure C-20-C**).

- b. Transformation génétique racinaire pour l'obtention de plantes chimériques et mise au point d'un système expérimental adapté pour le phénotypage en réponse à *Verticillium*

La transformation génétique stable de *Medicago truncatula* étant difficile à réaliser (seuls les génotypes R108 et 2HA ont été transformés et régénérés avec succès (Trinh *et al.*, 1998; Chabaud *et al.*, 2003; Crane *et al.*, 2006)), la transformation racinaire et la validation de nos candidats en utilisant des plantes chimériques ont été envisagées. Cette alternative nous est apparue adéquate car les racines du génotype A17 (accession séquencée et résistante à *Va* V31-2) peuvent être transformées (Boisson-Dernier *et al.*, 2001) et c'est au niveau des racines que la résistance à *Va* V31-2 s'exprime. L'étude microscopique de la colonisation racinaire d'A17 par une souche GFP de *Va* V31-2 a montré que le champignon était complètement éradiqué sept jours après inoculation (Toueni *et al.*, 2016).

Les premières expériences de validation fonctionnelle ont été réalisées *in vitro* : après deux semaines sur milieu sélectif (milieu Fahraeus et hygromycine à 10 mg/L) les plantules transformées étaient transférées sur milieu Fahraeus sans antibiotique, puis inoculées par *Va* V31-2 une semaine après transfert. Cette inoculation a consisté à couper 0,5 cm de racines puis à déposer 100 µL d'une solution de spores de *Va* V31-2 à 10⁶ sp/mL au niveau des racines sectionnées. L'évolution des symptômes de maladie a été observée pendant 4 semaines. Les résultats obtenus se sont révélés inexploitablement puisque toutes les plantes (inoculées ou non par le pathogène) mourraient rapidement. Le système de culture et d'inoculation racinaire de plantes transgéniques chimériques sur sable et perlite a donc été mis en place : au lieu de transférer les plantules chimériques vers un milieu Fahraeus sans antibiotique, elles ont été transférées en substrat sable et perlite, acclimatées pendant une semaine (Chabaud *et al.*, 2007) puis inoculées par un bain de 30 minutes dans la solution de spore de *Va* V31-2 à 10⁶ sp/mL après avoir sectionné 0,5 cm de racines. Après inoculation, le suivi du développement des symptômes a été réalisé pendant 4 semaines (*cf.* **Figure B-17** page 192).

C. RÉSULTATS

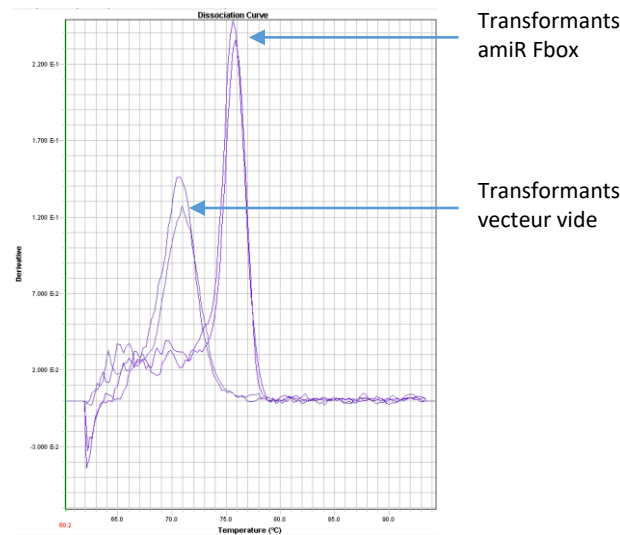


Figure C-21 : Exemples de courbes de dissociation après qRT-PCR de l'amiR F-BOX sur un pool de racines de trois plantes transformées avec le vecteur vide (contrôle) ou avec l'amiR F-BOX issues du fond génétique A17.

Deux répétitions techniques ont été réalisées pour chacun des échantillons. Chaque échantillon est constitué d'un pool de racines de trois plantes transformées.

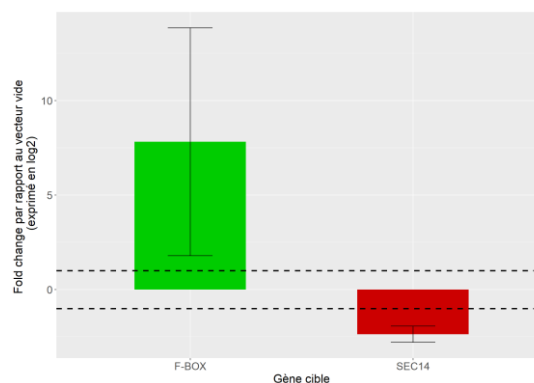


Figure C-22 : Expression relative des gènes Medtr7g070440 et Medtr7g070480 codant respectivement pour des protéines F-BOX et SEC14 dans des racines transgéniques exprimant les amiRs F-BOX et SEC14 et issues du fond génétique A17.

Le fold change ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) est calculé par rapport à la plante témoin transformée avec le vecteur vide ($\Delta\Delta C_t = (C_{t_{cible}} - C_{t_{standard}})_{\text{vecteur amiR}} - (C_{t_{cible}} - C_{t_{standard}})_{\text{vecteur vide}}$). En vert, expression relative du gène Medtr7g070440 dans les plantes transgéniques exprimant l'amiR ciblant ce gène. En rouge, expression relative du gène Medtr7g070480 dans les plantes transgéniques exprimant l'amiR ciblant ce gène. Les traits horizontaux en pointillé correspondent au fold change -1 et 1. Deux expériences indépendantes avec chacune deux répétitions techniques par échantillon ont été réalisées. Les barres d'erreur représentent l'écart-type obtenu pour les deux expériences indépendantes.

Chaque échantillon est constitué d'un pool de racines de trois plantes transformées.

c. Extinction de l'expression racinaire des candidats par amiR chez les accessions résistante A17 et sensible F83005.5

Vérification de l'expression et de l'efficacité des amiRs pour l'extinction de l'expression des gènes cibles

L'expression des amiRs SEC14 (ciblant le gène Medtr7g070480) et F-BOX (ciblant le gène Medtr7g070440) a été évaluée par qRT-PCR. La **Figure C-21** est une représentation des courbes de dissociation obtenues à partir de racines de plantes transformées avec le vecteur vide (contrôle) ou avec l'amiR F-BOX (fond génétique A17) lors de la quantification de l'amiR F-BOX par qRT-PCR. Il n'y a pas de superposition des courbes de dissociation pour les deux types d'échantillons mais un écart de 6°C, deux produits différents sont donc détectés par l'appareil. De plus, aucune fluorescence n'est détectée pour l'échantillon de racines transformées avec le vecteur vide ($C_t > 34$) alors qu'elle est détectée pour l'échantillon de racines transformées avec l'amiR F-BOX ($C_t = 31,3$). Cette analyse nous permet de conclure que l'amiR F-BOX est exprimé dans les racines transgéniques transformées avec l'amiR F-BOX. Des résultats équivalents ont été trouvés pour les plantes dont les racines ont été transformées avec l'amiR SEC14.

L'expression des gènes codant pour la protéine SEC14 (Medtr7g070480) et la protéine F-BOX (Medtr7g070440) a également été quantifiée dans des racines de plantes transformées par l'amiR SEC14 ou par l'amiR F-BOX respectivement. Les fold change calculés par rapport à l'expression des gènes dans les racines des plantes transformées avec le vecteur vide ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ où $\Delta\Delta C_t = (C_{t_{cible}} - C_{t_{standard}})_{\text{vecteur amiR}} - (C_{t_{cible}} - C_{t_{standard}})_{\text{vecteur vide}}$) montrent une diminution de l'expression du gène Medtr7g070480 codant pour la protéine SEC14 dans les racines transformées par l'amiR SEC14, et une augmentation de l'expression du gène Medtr7g070440 codant pour la protéine F-BOX dans les racines transformées par l'amiR F-BOX (**Figure C-22**). L'amiR SEC14 permet donc bien de réduire l'expression du gène Medtr7g070480 (fold change moyen de -2,4). En revanche, ce n'est pas le cas pour le gène codant pour la F-BOX (Medtr7g070440), l'amiR utilisé s'est avéré inefficace pour réduire l'expression de ce gène. L'inefficacité de l'amiR n'est pas inattendue, plusieurs constructions sont parfois nécessaires afin d'obtenir une réduction de l'expression du gène cible. Par exemple, afin d'obtenir quatre amiRs ciblant les flotillines (*FLOT1*, *FLOT2*, *FLOT3*, et *FLOT4*) de *Medicago truncatula*, 12 amiRs ont été testés et certains ne jouaient pas le rôle attendu (Haney and Long, 2010).

Des résultats probants ayant déjà été acquis avec l'amiR SEC14 ciblant le gène Medtr7g070480 et par manque de temps, le clonage et la validation fonctionnelle du gène codant pour la F-BOX n'ont pas été poursuivis.

C. RÉSULTATS

Tableau C-6 : Effectifs de plantes chimériques transformées avec le vecteur vide ou le vecteur contenant l'amiR ciblant le gène Medtr7g070480 et rendement de transformation par répétitions indépendantes.

A17 est l'accèsion résistante à *Va* V31.2, F83005.5 est sensible à *Va* V31.2.

Fond génétique	Vecteurs	Répétitions	Nombre de plantes inoculées par <i>Va</i> V31-2	Nombre de plantes témoins	Rendement de transformation
A17	Vecteur vide	Répétition 1	13	11	20,6%
		Répétition 2	12	12	19,3%
	amiR SEC14	Répétition 1	15	11	25%
		Répétition 2	13	14	22,4%
F83005.5	Vecteur vide	Répétition 1	9	8	10%
		Répétition 2	9	9	11%
	amiR SEC14	Répétition 1	9	8	10%
		Répétition 2	14	12	15%

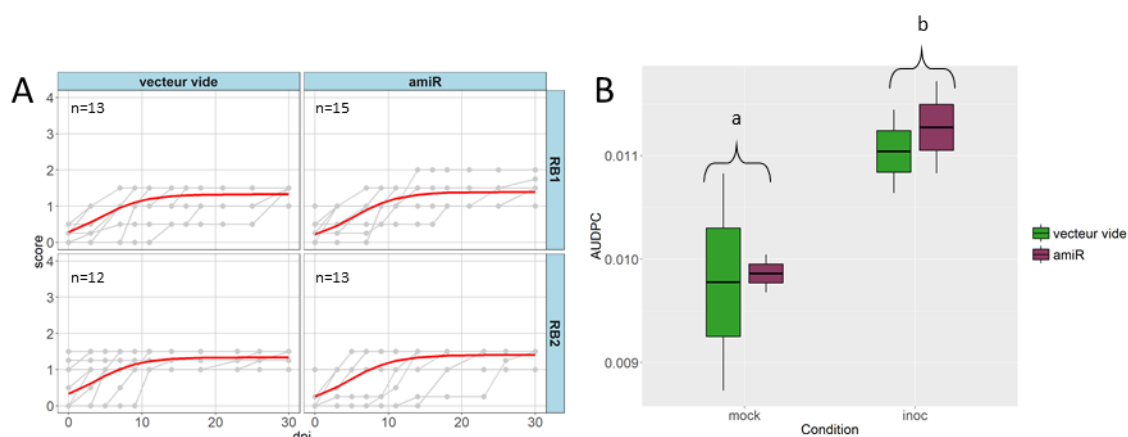


Figure C-23 : Modélisation du développement des symptômes de la verticilliose et AUDPC chez des plantes chimériques transformées avec le vecteur vide ou le vecteur contenant l'amiR SEC14 ciblant le gène Medtr7g070480 issues du fond génétique A17.

A. Modélisation du développement des symptômes de flétrissement chez les plantes inoculées par *Va* V31-2 pour deux répétitions indépendantes. Sont représentées en gris les courbes des symptômes par plante et en rouge, la courbe de modélisation. n correspond au nombre de plantes par condition.

B. Distribution des moyennes des deux répétitions des AUDPC des plantes contrôles (mock) et inoculées par *Va* V31-2 (inoc) en fonction du vecteur (« vecteur vide » ou « amiR ») utilisé pour la transformation génétique racinaire. Les lettres correspondent aux groupes de moyennes obtenus avec le test de Student-Newman-Keuls en comparant les conditions « mock » et « inoc ».

Tableau C-7 : Moyennes et écarts-types des phénotypes et paramètres de modélisation de la verticilliose des plantes chimériques transformées avec le vecteur vide ou le vecteur amiR SEC14 et inoculées par *Verticillium alfalfae* V31-2.

Fonds génétiques	Vecteurs	MSS		AUDPC		Asym		xmid		scal	
		Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type
A17	Vecteur vide	1,410	0,175	0,0110	0,0026	1,332	0,0030	3,870	0,193	3,103	0
	amiR SEC14	1,473	0,196	0,0113	0,0029	1,329	0,0041	4,443	0,193	3,103	0
F83005.5	Vecteur vide	2,958	0,698	0,0168	0,0039	2,888	0,078	13,161	0,534	2,610	0,285
	amiR SEC14	2,795	0,544	0,0152	0,0021	2,671	0,078	13,342	0,534	2,213	0,285

Réponse à l'inoculation par *Va* V31-2 des plantes chimériques transformées avec le vecteur amiR ciblant le gène Medtr7g070480 codant pour une protéine SEC14

Afin de valider le rôle du gène Medtr7g070480 codant pour une protéine SEC14 dans la résistance à *Va* V31-2 chez *Medicago truncatula*, l'expression de ce gène a été éteinte au sein de racines de plantes chimériques issues des fonds génétiques résistant A17 et sensible F83005.5.

Deux répétitions biologiques ont été effectuées pour chacun des deux génotypes. Le rendement de transformation et le nombre de plantes chimériques utilisées par condition d'inoculation sont précisés dans le **Tableau C-6**. Ce rendement de transformation est très dépendant du génotype des plantes : il est 10% plus faible chez F83005.5 que chez A17. Une légère différence de rendement est également visible entre le vecteur vide et le vecteur amiR ciblant le gène Medtr7g070480 dit vecteur amiR SEC14.

En condition non inoculée, les plantes chimériques transformées avec le vecteur vide ou le vecteur amiR SEC14 et issues des fonds génétiques A17 et F83005.5 ne présentent aucune différence significative d'AUDPC ou de MSS (**Figure C-23-B**, **Figure C-24-B** et **Tableau C-8**). Le vecteur utilisé n'influence donc pas l'état sanitaire et la vigueur des plantes chimériques issues des fonds génétiques A17 et F83005.5.

Après inoculation par *Va* V31-2 des plantes chimériques issues du génotype résistant A17, peu de symptômes de flétrissement apparaissent chez les plantes transformées avec le vecteur vide ou le vecteur amiR SEC14 (**Figure C-23-A**). Néanmoins, l'analyse de variance réalisée sur les phénotypes MSS permet de mettre en évidence un effet inoculation : les plantes chimériques transformées par le vecteur vide ou le vecteur amiR SEC14 ont des MSS différents (**Tableau C-8-A**, *P-value* de 0,0345). Toutefois, il n'y a pas non plus de différences significatives pour les phénotypes MSS et AUDPC en condition inoculée entre ces deux types de plantes chimériques issues du génotype A17 (**Tableau C-7** et **Tableau C-8-B**). Lors des deux répétitions biologiques, les paramètres de modélisation Asym, xmid et scal en condition inoculée ne montrent aucune différence significative entre les plantes chimériques transformées par le vecteur vide ou le vecteur amiR SEC14 (**Tableau C-7**).

Après inoculation, les plantes chimériques issues du génotype sensible F83005.5 transformées avec le vecteur vide ou avec le vecteur amiR SEC14 présentent plus de symptômes de flétrissement que les plantes chimériques issues du fond génétique A17 (**Figure C-24-A**). Il existe un effet inoculation pour les phénotypes MSS et AUDPC : les plantes chimériques inoculées par *Va* V31-2 ont des MSS et AUDPC significativement plus élevées que les plantes chimériques témoins non inoculées (**Tableau C-7** et **Tableau C-8-A**, *P-values* respectivement de $9,04.e^{-3}$ et $6,03.e^{-3}$). En condition inoculée, le MSS et l'AUDPC des plantes chimériques exprimant l'amiR SEC14 ou le vecteur vide ne sont pas significativement différentes (**Figure C-24-B**, **Tableau C-7** et **Tableau C-8-B**). De même, les paramètres

C. RÉSULTATS

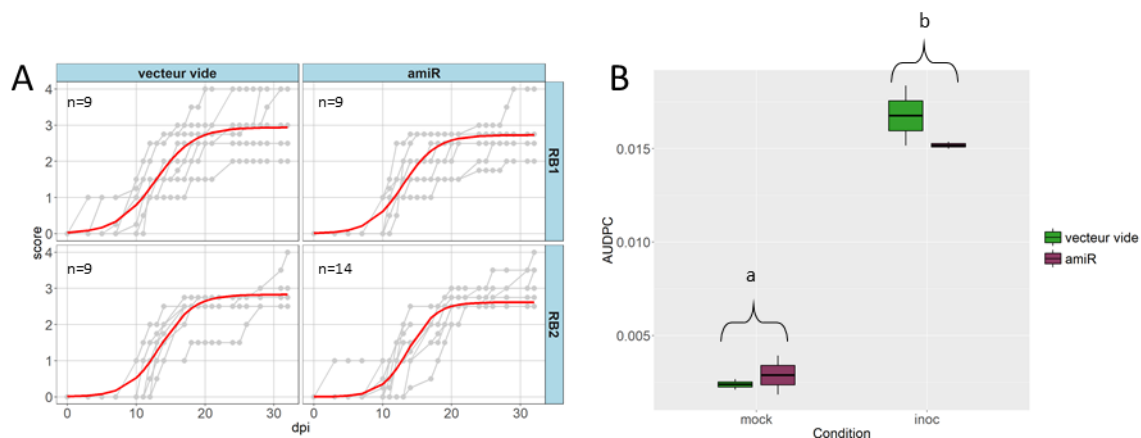


Figure C-24 : Modélisation du développement des symptômes de la verticilliose et AUDPC chez des plantes chimériques transformées avec le vecteur vide ou le vecteur amiR SEC14 issues du fond génétique F83005.5.

A. Modélisation du développement des symptômes de flétrissement chez les plantes inoculées par *Va* V31-2 pour deux répétitions indépendantes. Sont représentées en gris les courbes des symptômes par plante et en rouge, la courbe de modélisation. n correspond au nombre de plantes par condition.

B. Distribution des moyennes des deux répétitions des AUDPC des plantes contrôles (mock) et inoculées par *Va* V31-2 (inoc) en fonction du vecteur (« vecteur vide » ou « amiR ») utilisé pour la transformation génétique racinaire. Les lettres correspondent aux groupes de moyennes obtenus avec le test de Student-Newman-Keuls en comparant les conditions « mock » et « inoc ».

Tableau C-8 : Tables d'ANOVA des phénotypes MSS et AUDPC des plantes chimériques transformées avec le vecteur vide ou le vecteur amiR SEC14.

A. Analyse sur la totalité des plantes chimériques.

B. Analyse sur les plantes chimériques inoculées par *Va* V31-2.

ddl : Degré de liberté, AUDPC : Area Under the Disease Progress Curve, MSS : Maximum Symptom Score. ANOVA réalisée sans transformation de données afin de valider les postulats. Les valeurs des *P-values* sont indiquées.

A

Sources de variation	ddl	A17		F83005.5	
		MSS	AUDPC	MSS	AUDPC
Répétitions	1	0,5213	0,405	0,624	0,704
Conditions	1	0,0345*	0,118	7,28.e-4***	1,28.e-3***
Vecteurs	1	0,5213	0,813	0,756	0,659
Condition : Vecteurs	1	0,9038	0,912	0,511	0,423
Résiduelle	3				

B

Sources de variation	ddl	A17		F83005.5	
		MSS	AUDPC	MSS	AUDPC
Répétitions	1	0,32	0,969	0,861	0,574
Vecteurs	1	0,329	0,829	0,681	0,539
Résiduelle	1				

C. RÉSULTATS

de modélisation Asym, xmid et scal sont plus élevés pour les plantes chimériques transformées avec le vecteur vide que pour les plantes transformées avec le vecteur amiR SEC14 mais cette différence n'est pas significative (**Tableau C-7**).

Des différences significatives entre les conditions inoculées et non inoculées ont été mises en évidence chez les plantes chimériques transformées avec le vecteur vide ou avec le vecteur amiR SEC14 issues des fonds génétiques A17 et F83005.5. Cependant, quelque soit le fond génétique, en condition inoculée par *Va* V31-2, les plantes transformées par le vecteur vide et par le vecteur amiR SEC14 ne montrent aucune différence de symptômes ou de développement de la maladie.

Afin d'obtenir des résultats significatifs, de nouvelles répétitions biologiques pourraient être réalisées. De plus, ces résultats peuvent également s'expliquer par un développement occasionnel de racines secondaires sauvages qui ont été observées lors du suivi des symptômes de maladie. Cela pouvait ainsi contrecarrer la diminution de l'expression du gène Medtr7g070480 codant pour la protéine SEC14 par l'amiR SEC14 au niveau du système racinaire de ces plantes.

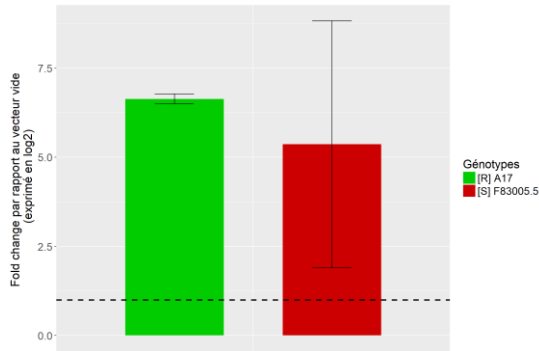


Figure C-25 : Expression relative du gène Medtr7g070480 codant une protéine SEC14 dans des racines transgéniques exprimant la séquence codante du gène Medtr7g070480 et issues des fonds génétiques A17 et F83005.5.

Le fold change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) est calculé par rapport à l'échantillon témoin transformée avec le vecteur vide ($\Delta\Delta Ct = (Ct_{cible} - Ct_{standard})_{vecteur\ surexpression} - (Ct_{cible} - Ct_{standard})_{vecteur\ vide}$). En vert, expression relative du gène Medtr7g070480 dans les plantes transgéniques issues du fond génétique A17 et exprimant la séquence codante du gène Medtr7g070480. En rouge, expression relative du gène Medtr7g070480 dans les plantes transgéniques issues du fond génétique F83005.5 et exprimant la séquence codante du gène Medtr7g070480. Le trait horizontal en pointillé correspond au fold change de 1. Deux expériences indépendantes avec chacune deux répétitions techniques par échantillon ont été réalisées. Les barres d'erreur représentent l'écart-type obtenu pour les deux expériences indépendantes. Chaque échantillon est constitué d'un pool de racines de trois plantes transformées.

Tableau C-9 : Effectifs de plantes chimériques transformées avec le vecteur vide ou le vecteur contenant la séquence codante du gène Medtr7g070480 et rendement de transformation par répétitions indépendantes

Fonds génétiques	Vecteurs	Répétitions	Nombre de plantes inoculées par Va V31-2	Nombre de plantes témoins	Rendement de transformation
A17	Vecteur vide	Répétition 1	9	8	18,1%
		Répétition 2	4	3	14,3%
		Répétition 3	4	4	15%
		Répétition 4	3	4	10%
	surexpression SEC14	Répétition 1	8	7	17,4%
		Répétition 2	3	1	8,3%
		Répétition 3	4	6	15,5%
		Répétition 4	4	7	7,5%
F83005.5	Vecteur vide	Répétition 1	11	8	11%
		Répétition 2	10	9	14,4%
		Répétition 3	7	7	12,3%
	surexpression SEC14	Répétition 1	14	12	8,4%
		Répétition 2	9	9	15,6%
		Répétition 3	7	7	13,4%

Tableau C-10 : Moyennes et écarts-types des phénotypes et paramètres de modélisation de la verticilliose des plantes chimériques transformées avec le vecteur vide ou le vecteur contenant la séquence codante de Medtr7g070480 et inoculées par *Verticillium alfalfae* V31-2.

Fonds génétiques	Vecteurs	MSS		AUDPC		Asym		xmid		scal	
		Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type
A17	Vecteur vide	1,592	0,987	0,0112	0,0052	1,311	0,331	3,623	2,379	3,246	0,439
	Surexpression SEC14	1,539	0,987	0,0102	0,0069	1,306	0,369	7,050	2,379	3,246	0,439
F83005.5	Vecteur vide	2,929	0,997	0,0152	0,0060	1,835	1,207	10,386	4,846	2,241	1,468
	Surexpression SEC14	3,108	0,887	0,0163	0,0066	1,854	1,301	10,268	4,997	2,334	1,538

C. RÉSULTATS

- d. Surexpression racinaire du gène candidat Medtr7g070480 codant pour une protéine SEC14 chez les accessions résistante A17 et sensible F83005.5

Vérification de l'expression du gène Medtr7g070480 dans les racines des plantes chimériques issues des génotypes A17 et F83005.5

L'expression du gène codant pour la protéine SEC14 (Medtr7g070480) a été quantifiée dans un pool de racines de trois plantes chimériques transformées par le vecteur contenant la séquence codante du gène Medtr7g070480 et par le vecteur vide et issues des fonds génétiques A17 et F83005.5 dans deux expériences indépendantes. Les fold change calculés par rapport à l'expression du gène Medtr7g070480 dans les racines des plantes transformées avec le vecteur vide ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ où $\Delta\Delta Ct = (Ct_{cible} - Ct_{standard})_{vecteur surexpression} - (Ct_{cible} - Ct_{standard})_{vecteur vide}$) montrent une augmentation de l'expression du gène Medtr7g070480 dans les racines transformées par le vecteur contenant la séquence codante du gène Medtr7g070480 et ce, quelque soit le fond génétique des plantes chimériques (**Figure C-25**, fold change moyen respectivement de 6,63 et 5,37).

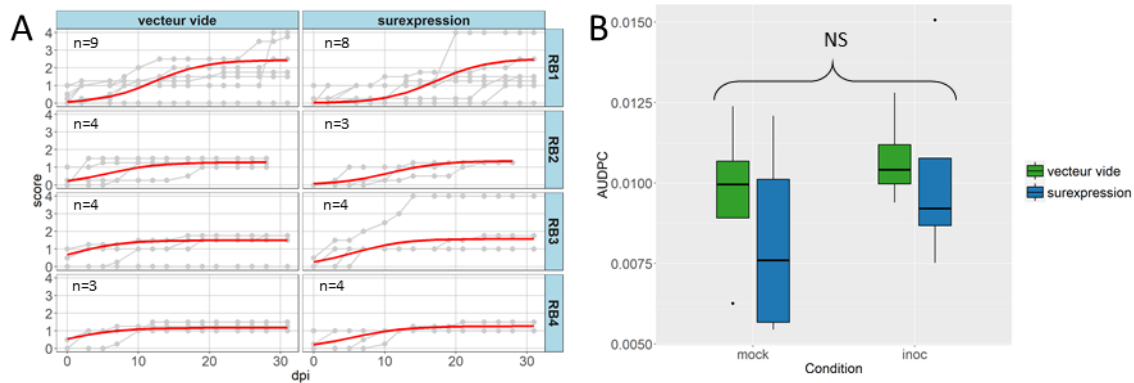


Figure C-26 : Modélisation du développement des symptômes de la verticilliose et AUDPC chez des plantes chimériques transformées avec le vecteur vide ou le vecteur de sur-expression contenant la séquence codante du gène Medtr7g070480 issues du fond génétique A17.

A. Modélisation du développement des symptômes de flétrissement chez les plantes inoculées par *Va* V31-2 pour quatre répétitions indépendantes. Sont représentées en gris les courbes des symptômes par plante et en rouge, la courbe de modélisation. n correspond au nombre de plantes par condition.

B. Distribution des moyennes des quatre répétitions des AUDPC des plantes contrôles (mock) et inoculées par *Va* V31-2 (inoc) en fonction du vecteur (« vecteur vide » ou « surexpression ») utilisé pour la transformation génétique racinaire.

NS : Différence non significative entre les conditions « mock » et « inoc ».

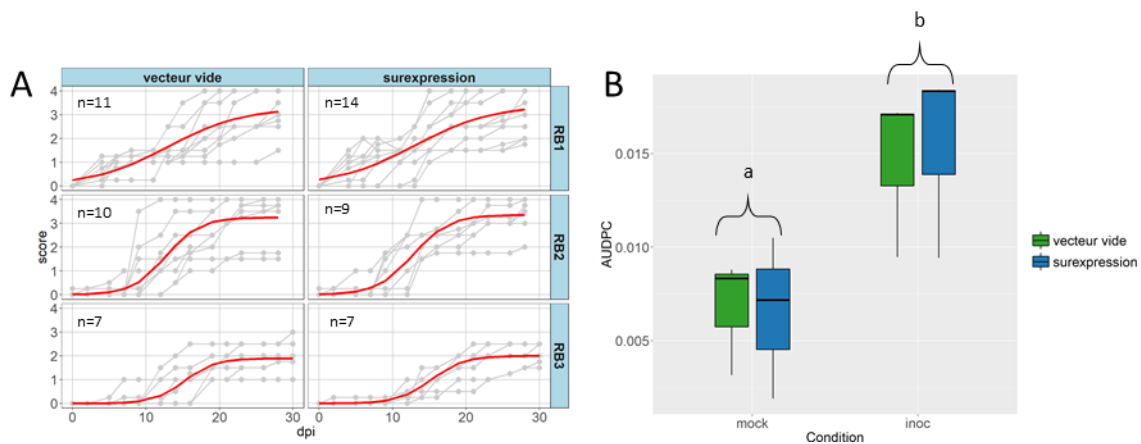


Figure C-27 : Modélisation du développement des symptômes de la verticilliose et AUDPC chez des plantes chimériques transformées avec le vecteur vide ou le vecteur de sur-expression contenant la séquence codante du gène Medtr7g070480 issues du fond génétique F83005.5.

A. Modélisation du développement des symptômes de flétrissement chez les plantes inoculées par *Va* V31-2 pour trois répétitions indépendantes. Sont représentées en gris les courbes des symptômes par plante et en rouge, la courbe de modélisation. n correspond au nombre de plantes par condition.

B. Distribution des moyennes des trois répétitions des AUDPC des plantes contrôles (mock) et inoculées par *Va* V31-2 (inoc) en fonction du vecteur (« vecteur vide » ou « surexpression ») utilisé pour la transformation génétique racinaire. Les lettres correspondent aux groupes de moyennes obtenus avec le test de Student-Newman-Keuls en comparant les conditions « mock » et « inoc ».

Réponse à l'inoculation par *Va* V31-2 des plantes chimériques transformées avec le vecteur contenant la séquence codante du gène Medtr7g070480

Pour valider le rôle du gène Medtr7g070480 codant pour une protéine SEC14 dans la résistance à *Va* V31-2 chez *Medicago truncatula*, ce gène a été surexprimé au sein de racines de plantes chimériques issues des fonds génétiques résistant A17 et sensible F83005.5.

Quatre répétitions indépendantes ont été réalisées chez l'accession résistante A17, trois chez l'accession sensible F83005.5. Le rendement de transformation et le nombre de plantes chimériques utilisées par condition d'inoculation sont précisés dans le **Tableau C-9**.

En condition non inoculée par *Va* V31-2, les plantes chimériques transformées avec le vecteur vide ou le vecteur de sur-expression contenant la séquence codante du gène Medtr7g070480 (dit vecteur surexp SEC14) et issues des fonds génétiques A17 et F83005.5 ne présentent aucune différence significative d'AUDPC ou de MSS (**Tableau C-11**, **Figure C-26-B** et **Figure C-27-B**). Le vecteur utilisé n'influence donc pas l'état sanitaire et la vigueur des plantes chimériques issues des fonds génétiques A17 et F83005.5.

La **Figure C-26** présente les résultats obtenus pour les plantes chimériques du fond génétique résistant A17. Après inoculation par *Va* V31-2, les phénotypes MSS et AUDPC ne présentent pas de différences significatives entre les plantes chimériques inoculées et les plantes chimériques témoins. Il n'y a pas non plus de différences en termes de MSS et d'AUDPC entre les plantes chimériques transformées par le vecteur vide et le vecteur surexp SEC14 (**Tableau C-11**). Les paramètres de modélisation Asym, xmid et scal ne sont pas différents entre les plantes chimériques transformées avec le vecteur vide ou le vecteur surexp SEC14 (**Tableau C-10**).

Chez l'accession sensible F83005.5 (**Figure C-27**), l'inoculation par *Va* V31-2 a un effet significatif sur le MSS et l'AUDPC, les plantes transformées avec le vecteur vide ou le vecteur de surexpression du gène Medtr7g070480 présentent un MSS et une AUDPC plus élevés qu'en condition contrôle (**Tableau C-11-A**, *P-values* respectivement de $7,82 \cdot 10^{-4}$ et 0,011). En revanche, il n'y a pas de différences significatives entre les plantes chimériques surexprimant le gène Medtr7g070480 ou transformées avec le vecteur vide (**Tableau C-11-B**). En ce qui concerne les paramètres de modélisation Asym, xmid et scal, ils ne présentent pas de différences significatives entre plantes chimériques issues du fond génétique F83005.5 transformées avec le vecteur vide ou avec le vecteur surexp SEC14 (**Tableau C-10**).

Malgré l'augmentation du nombre de répétitions, aucun résultat significatif ne se dégage. Un double promoteur 35S devant la séquence codante du gène candidat nous aurait peut-être permis d'obtenir des résultats significatifs.

C. RÉSULTATS

Tableau C-11 : Tables d'ANOVA des phénotypes MSS et AUDPC des plantes chimériques transformées avec le vecteur vide ou le vecteur surexp SEC14.

A. Analyse sur la totalité des plantes chimériques. B. Analyse sur les plantes chimériques inoculées par V31-2. ddl: degré de liberté, AUDPC : Area Under the Disease Progress Curve, MSS : Maximum Symptom Score. ANOVA réalisée sans transformation de données afin de valider les postulats. Les valeurs des *P-values* sont indiquées.

A

Sources de variation	A17			F83005.5		
	ddl	MSS	AUDPC	ddl	MSS	AUDPC
Répétitions	3	0,1846	0,299	2	0,315	0,259
Conditions	1	0,0626	0,251	1	7,82.e^{-4***}	0,011*
Vecteurs	1	0,7493	0,468	1	0,921	0,903
Condition : Vecteurs	1	0,5873	0,721	1	0,679	0,0826
Résiduelle	9			6		

B

Sources de variation	A17			F83005.5		
	ddl	MSS	AUDPC	ddl	MSS	AUDPC
Répétitions	3	0,317	0,712	2	9,04.e^{-3***}	6,03.e^{-3***}
Vecteurs	1	0,877	0,825	1	0,020	0,197
Résiduelle	3			1		

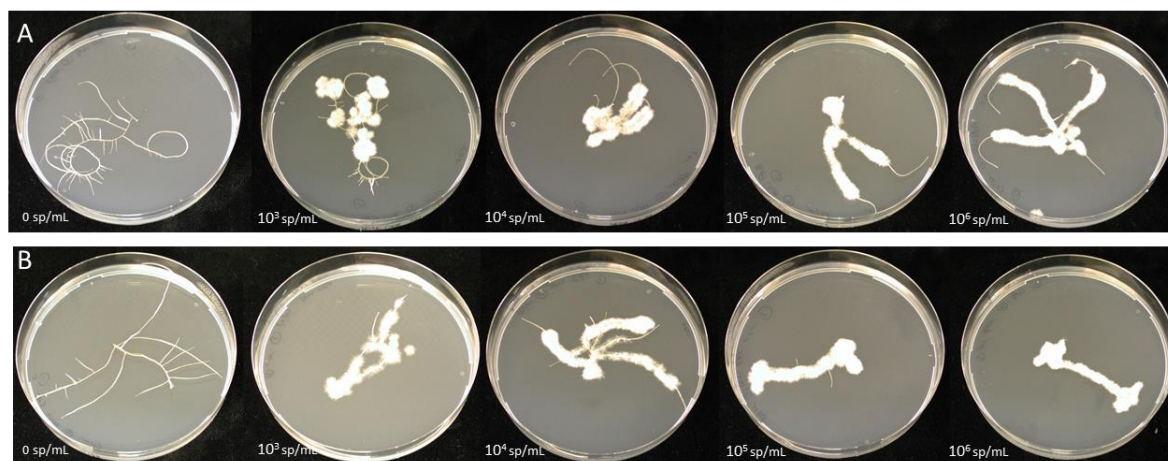


Figure C-28 : Colonisation à 7 jours après inoculation par *Verticillium alfalfae* V31-2 de racines transgéniques transformées avec le vecteur vide chez A17 (A) et F83005.5 (B) aux concentrations 0, 10³, 10⁴, 10⁵, et 10⁶ spores/mL.

Tableau C-12 : Table d'ANOVA du phénotype colonisation à sept jours après inoculation des racines transgéniques transformées avec le vecteur vide chez A17 et F83005.5.

ddl : degré de liberté, colonisation : longueur racinaire colonisée par *Va* V31-2 divisée par la longueur racinaire totale. Les concentrations de spores utilisées lors de l'inoculation sont 10³sp/mL, 10⁴sp/mL et 10⁵sp/mL ANOVA réalisée en transformant les données afin de valider les postulats ($\sin^{-1}(\sqrt{\text{Colonisation}/100})$). Les valeurs des *P-values* sont indiquées.

Sources de variation	ddl	Colonisation
Répétitions	1	3,19.e^{-6***}
Génotypes	1	0,0354*
Concentrations	2	0,0632.
Génotype : Concentrations	2	0,3124
Résiduelle	21	

3. Validation fonctionnelle sur racines transgéniques cultivées *in vitro* (hairy roots)

a. Mise au point du protocole expérimental

L'absence de résultats significatifs sur le développement et l'évolution des symptômes de flétrissement foliaire en surexprimant ou en diminuant l'expression du gène Medtr7g070480 codant pour la protéine SEC14 chez des plantes chimériques issues des génotypes A17 et F83005.5 nous a amené à mettre au point un nouveau protocole de validation fonctionnelle sur des racines transgéniques cultivées *in vitro* (ou hairy roots).

Ainsi, deux semaines après transformation et culture sur milieu sélectif (milieu Fahraeus et hygromycine à 10 mg/L), les plantules ont été transférées sur milieu MS+ augmentin à 400 mg/L pendant vingt jours. Les parties aériennes des plantules sont alors retirées, et seules les racines sont conservées sur milieu MS. Après deux semaines de croissance, des portions de 2 à 2,5 cm de racines sont prélevées et déposées sur MS. Après trois jours de culture, ces portions de racines sont inoculées par *Va* V31-2 en déposant 10 µL d'une suspension de spores à chaque extrémité préalablement blessée en retirant de 0,3 à 0,6 cm de racine. Pour les racines transgéniques témoins (non inoculées), 10 µL d'eau stérile sont déposés. Ce système de culture et d'inoculation a été mis au point en s'inspirant de travaux réalisés chez le pathosystème *Medicago truncatula/Ustilago maydis* (Mazaheri-Naeini *et al.*, 2015). Pour caractériser la réponse à *Verticillium alfalfae* V31-2 des racines transgéniques, la proportion de racines colonisées par le champignon est calculée à sept jours après inoculation. Elle correspond au rapport de la longueur de racine colonisée sur la longueur totale des racines. Le second phénotype évalué correspond à l'accroissement racinaire en sept jours (longueur racinaire totale à 7 jours après inoculation – longueur racinaire totale le jour de l'inoculation). L'ensemble de ces données sont analysées grâce à l'acquisition et au traitement informatique d'images avec le logiciel ImageJ.

La première étape de mise au point du protocole expérimental a consisté à déterminer la concentration optimale de spores pour l'inoculation afin de mettre en évidence des différences de phénotypes entre l'accession résistante (A17) et sensible (F83005.5) à *V. alfalfae* V31-2. Ainsi, des fragments de racines transgéniques transformées avec le vecteur vide ont été inoculés soit par de l'eau (témoin) soit par *V. alfalfae* V31-2 aux concentrations 10^3 sp/mL, 10^4 sp/mL, 10^5 sp/mL et 10^6 sp/mL (**Figure C-28**). Une analyse de variance réalisée sur deux répétitions biologiques des tests réalisés à 10^3 sp/mL, 10^4 sp/mL et 10^5 sp/mL a mis en évidence le fait que la colonisation à sept jours après inoculation dépendait du génotype (*P-value* : 0,0354) et qu'il existait un effet subsignificatif de la concentration de la suspension de spore (*P-value* : 0,0632) sur ce phénotype (**Tableau C-12**). Des données ayant été acquises pour la concentration 10^6 sp/mL lors d'une unique répétition, ces dernières n'ont pas été incluses dans l'analyse statistique. Un test de Student-Newman-Keuls subsignificatif a

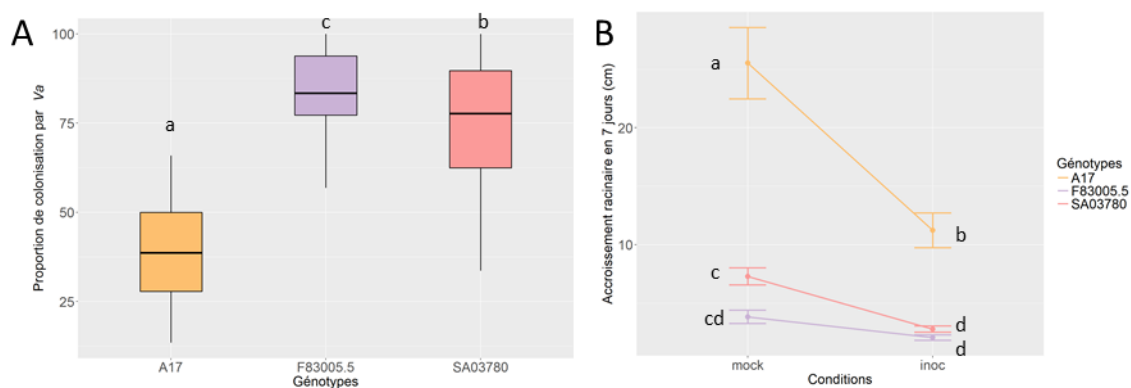


Figure C-29 : Colonisation à sept jours après inoculation par *Verticillium alfalfae* V31-2 (A) et accroissement en sept jours après inoculation (B) de racines transgéniques transformées avec le vecteur vide issues de trois génotypes de *Medicago truncatula* connus pour leur réponse contrastée à *Verticillium alfalfae* V31-2 en huit répétitions indépendantes (A17, résistant et F83005.5 et SA03780 sensibles).

Les lettres correspondent aux groupes de moyennes obtenus avec le test de Student-Newman-Keuls en comparant la proportion de colonisation en fonction des génotypes (A) et l'accroissement racinaire en fonction des génotypes et conditions d'inoculation (B).

Tableau C-13 : Tables d'ANOVA des phénotypes colonisation à sept jours après inoculation (A) et accroissement racinaire en sept jours (B) des racines transgéniques transformées avec le vecteur vide chez A17, F83005.5 et SA03780.

ddl : degré de liberté, colonisation : longueur racinaire colonisée par *Va* V31-2 divisée par la longueur racinaire totale. Accroissement : longueur racinaire à 7 jours après inoculation – longueur racinaire à 0 jours après inoculation. ANOVA réalisée en transformant les données afin de valider les postulats ($\sin^{-1}(\sqrt[2]{\text{Colonisation}/100})$ et $\sqrt[2]{\text{Accroissement}}$). Les valeurs des *P-values* sont indiquées.

A

Sources de variation	ddl	Colonisation
Répétitions	7	$<2,2.e^{-16***}$
Génotypes	2	$6,945.e^{-4***}$
Résiduelle	67	

B

Sources de variation	ddl	Accroissement
Répétitions	7	$<2,2.e^{-16***}$
Conditions	1	$<2,2.e^{-16***}$
Génotypes	2	$1,38.e^{-07***}$
Conditions : Génotypes	2	$1,59.e^{-07***}$
Résiduelle	146	

montré que 10^3 sp/mL était la concentration optimale pour observer des différences de colonisations entre les accessions A17 et F83005.5.

De nouvelles inoculations à 10^3 sp/mL ont ensuite été réalisées afin de confirmer les premiers résultats obtenus en utilisant des racines transgéniques transformées avec le vecteur vide issues des fonds génétiques A17, F83005.5 et SA03780, cette dernière accession ayant été précédemment décrite comme très sensible à *Va* V31-2 (Ben *et al.*, 2013a). Pour chaque génotype, des racines issues de plusieurs événements de transformation (c'est-à-dire générées à partir de différentes plantes transformées) sont utilisées (6 pour A17, 3 pour F83005.5 et 3 pour SA03780) afin de s'assurer de la reproductibilité des modifications phénotypiques observées.

Comme précédemment, à sept jours après inoculation, la proportion de racines colonisées par *Verticillium alfalfae* V31-2 dépend du génotype (*P-value* : 0,000695, **Tableau C-13-A**). Le test de comparaison multiple des moyennes de Student-Newman-Keuls permet de distinguer les trois génotypes : A17 est le plus résistant (39,33% de colonisation), suivi par SA03780 (74,74%) et F83005.5 (84,51%). Étonnamment, la lignée SA03780 est moins sensible à *Va* V31-2 dans ce système de culture que F83005.5 alors que ce n'est pas le cas *in vivo* (**Figure C-29-A**). Concernant l'accroissement racinaire en sept jours, il y a un effet d'interaction génotype : condition (*P-value* de l'ANOVA : $1,59.e^{-7}$, **Tableau C-13-B**) : l'accroissement du génotype A17 en condition contrôle ou inoculée est plus important que ceux de F83005.5 ou SA03780. L'accroissement racinaire de F83005.5 n'est pas significativement différent en condition contrôle et inoculée (**Figure C-29-B**).

La proportion de racines colonisées par *V. alfalfae* V31-2 et l'accroissement racinaire à sept jours après inoculation sont deux phénotypes qui nous permettent de discriminer le génotype résistant A17 et sensible F83005.5. Les résultats obtenus avec ces deux phénotypes après inoculation par *Va* V31-2 pour le génotype SA03780 ne correspondant pas à ceux observés *in vivo* (ce génotype est le plus sensible des trois étudiés), la réponse de ce génotype après inoculation par *Va* V31-2 n'a donc pas été évaluée lorsque l'expression du gène candidat est modifiée.

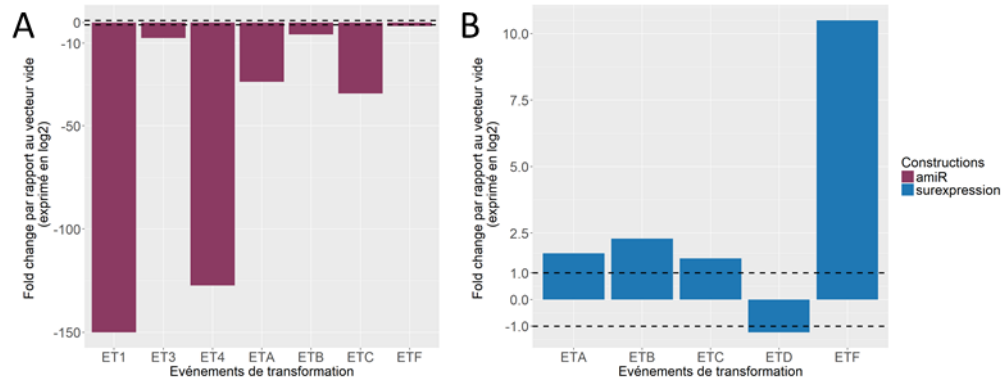


Figure C-30 : Expression du gène *SEC14* analysée par qRT-PCR dans des racines transgéniques transformées avec le vecteur amiR *SEC14* (A) ou avec le vecteur surexp *SEC14* (B) et issues du fond génétique A17.

Le niveau d'expression du gène est exprimé par le le fold change : $-1/2^{-\Delta\Delta Ct}$ avec $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{cible}} - Ct_{\text{standard}})_{\text{vecteur amiR}} - (Ct_{\text{cible}} - Ct_{\text{standard}})_{\text{vecteur vide}}$ ou $2^{-\Delta\Delta Ct}$ avec $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{cible}} - Ct_{\text{standard}})_{\text{vecteur surexpression}} - (Ct_{\text{cible}} - Ct_{\text{standard}})_{\text{vecteur vide}}$. Les événements de transformation correspondent à des racines générées à partir de différentes plantes transformées. Le trait horizontal en pointillé correspond aux fold changes de -1 et 1.

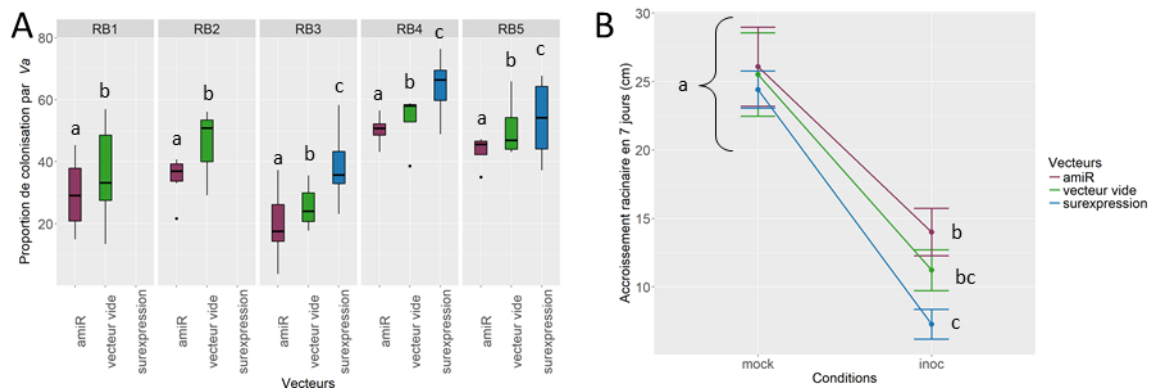


Figure C-31 : Colonisation à sept jours après inoculation par *Verticillium alfalfae* V31-2 (A) et accroissement en sept jours après inoculation (B) de racines transgéniques transformées avec le vecteur vide, le vecteur amiR *SEC14* et le vecteur surexp *SEC14* issues du génotype A17 pour 5 répétitions indépendantes.

Les lettres correspondent aux groupes de moyennes obtenus avec le test de Student-Newman-Keuls en comparant la proportion de colonisation en fonction du vecteur de transformation utilisé (A) et l'accroissement racinaire en fonction des conditions d'inoculation et du vecteur de transformation (B).

b. Extinction et surexpression du gène candidat Medtr7g070480 dans des hairy roots chez l'accèsion résistante A17

L'étude de l'expression du gène Medtr7g070480 codant pour une protéine SEC14 dans les hairy roots a permis de sélectionner l'ensemble des événements de transformation pour lesquelles l'expression du gène était bien sous-exprimée ou sur-exprimée. Cette étude a été réalisée par qRT-PCR à partir d'échantillons de racines transgéniques cultivées en conditions standards et prélevées six semaines après transformation. Ainsi, avec des variations du niveau d'expression de la SEC14 comprises entre -1,7 et -150 par rapport au contrôle (hairy roots transformées avec le vecteur vide), tous les événements de transformation ont été retenus pour la sous-expression du gène candidat dans les racines transformées avec le vecteur amiR SEC14 (**Figure C-30-A**). Pour la surexpression du gène, l'événement de transformation ETD n'a pas été retenu, le gène n'était pas surexprimé. La variation d'expression du gène SEC14 est comprise entre 1,7 et 10,5 par rapport au vecteur vide pour les quatre autres événements de transformation (**Figure C-30-B**).

La **Figure C-31-A** représente le taux de colonisation par *Va* V31-2 à 7 jours après inoculation des racines transgéniques issues du fond génétique A17 sous-exprimant ou sur-exprimant le gène SEC14 ou transformées avec le vecteur vide. Il existe une différence de taux de colonisation entre les différentes répétitions (P -value : $1,40.e^{-13}$, **Tableau C-14-A**), celle-ci pourrait s'expliquer en partie par une modification du milieu de culture MS (ouverture d'un nouveau pot entre les répétitions 3 et 4). L'analyse de variance met en évidence la différence de colonisation des racines transgéniques en fonction du vecteur de transformation utilisé (P -value : $6,52.e^{-6}$, **Tableau C-14-A**) : on remarque une colonisation réduite des racines transgéniques sous-exprimant le gène SEC14 (33,94%) et une colonisation plus importante des racines sur-exprimant ce candidat (51,14%) par rapport au contrôle vecteur vide (39,33%).

L'analyse de variance concernant l'accroissement racinaire en 7 jours après inoculation par *Va* V31-2 permet de constater un effet sub-significatif de l'interaction entre la condition (inoculée ou contrôle) et le vecteur de transformation (surexpression, sous-expression, vecteur vide) (P -value : 0,0936, **Tableau C-14-B**) : alors que l'accroissement des racines est identique pour l'ensemble des vecteurs en condition contrôle, l'accroissement des racines sur-exprimant le gène candidat SEC14 chute par rapport à celle des racines transformées avec le vecteur amiR SEC14 en condition inoculée par *Va* V31-2 (P -value : 0,0382). En revanche, l'accroissement des racines transformées avec le vecteur vide en condition inoculée n'est pas statistiquement différent de celui des racines sur-exprimant le gène candidat SEC14 (Test de Tuckey, P -value : 0,1489) ou de celui des racines sous-exprimant le gène candidat (Test de Tuckey, P -value : 0,3086, **Figure C-30-B**).

Tableau C-14 : Tables d'ANOVA des phénotypes colonisation à sept jours après inoculation (A) et accroissement racinaire en sept jours (B) des racines transgéniques transformées avec le vecteur vide, le vecteur amiR SEC14 et le vecteur surexp SEC14 chez A17.

ddl : degré de liberté, colonisation : longueur racinaire colonisée par *Va* V31-2 divisée par la longueur racinaire totale. Accroissement : longueur racinaire à 7 jours après inoculation – longueur racinaire à 0 jours après inoculation. ANOVA réalisée en transformant les données afin de valider les postulats ($\sin^{-1}(\sqrt[2]{\text{Colonisation}/100})$ et $\sqrt[2]{\text{Accroissement}}$). Les valeurs des *P-values* sont indiquées.

A

Sources de variation	ddl	Colonisation
Répétitions	4	1,40.e^{-13***}
Vecteurs	2	6,52.e^{-6***}
Résiduelle	82	

B

Sources de variation	ddl	Accroissement
Répétitions	4	2,09.e^{-12***}
Conditions	1	<2,2.e^{-16***}
Vecteurs	2	0,5988
Conditions : Vecteurs	2	0,0936.
Résiduelle	172	

C. RÉSULTATS

L'étude de racines transgéniques cultivées *in vitro* du fond génétique A17 a montré une colonisation racinaire de *Va* V31-2 significativement plus faible que le témoin lorsque le gène Medtr7g070480 est sous-exprimé et une colonisation significativement plus importante que le témoin lorsque le gène est surexprimé. Après inoculation par *Va* V31-2, l'accroissement des hairy roots surexprimant le gène codant pour la protéine SEC14 est significativement plus faible que celui des hairy roots sous-exprimant le gène alors que leur accroissement est similaire en condition contrôle non inoculée. Ces résultats suggèrent que le gène candidat Medtr7g070480 codant pour une protéine SEC14 serait un gène de sensibilité à *Verticillium alfalfae* V31-2 chez *Medicago truncatula*.

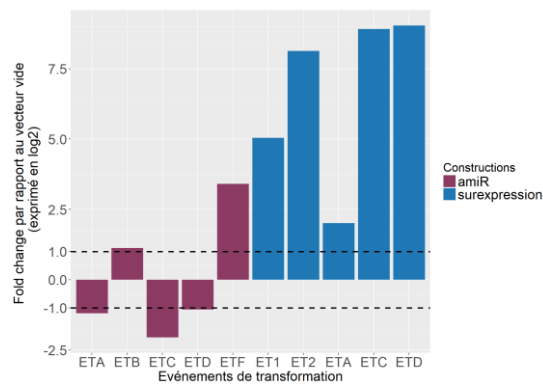


Figure C-32 : Expression du gène *SEC14* analysée par qRT-PCR dans des racines transgéniques transformées avec le vecteur amiR *SEC14* ou avec le vecteur surexp *SEC14* et issues du fond génétique F83005.5.

Le niveau d'expression du gène est exprimé par le le fold change : $-1/2^{-\Delta\Delta Ct}$ avec $\Delta\Delta Ct = (Ct_{cible} - Ct_{standard})_{\text{vecteur amiR}} - (Ct_{cible} - Ct_{standard})_{\text{vecteur vide}}$ ou $2^{-\Delta\Delta Ct}$ avec $\Delta\Delta Ct = (Ct_{cible} - Ct_{standard})_{\text{vecteur surexpression}} - (Ct_{cible} - Ct_{standard})_{\text{vecteur vide}}$. Les événements de transformation correspondent à des racines générées à partir de différentes plantes transformées. Le trait horizontal en pointillé correspond aux fold changes de -1 et 1.



Figure C-33 : Séquence génomique de la cible de l'amiR *SEC14* chez A17 et F83005.5.

Un polymorphisme de séquence au niveau du nucléotide 26 021 139 est visible (flèche violette).

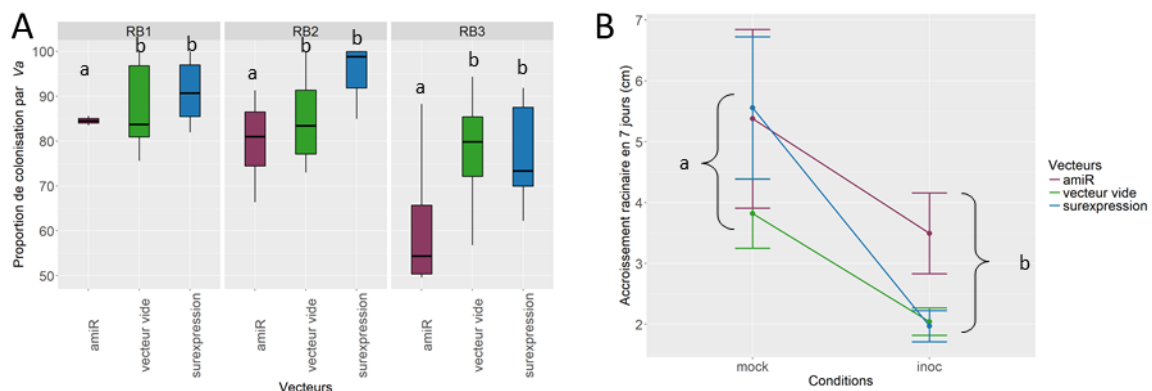


Figure C-34 : Colonisation à sept jours après inoculation par *Verticillium alfalfae* V31-2 (A) et accroissement en sept jours après inoculation (B) de racines transgéniques transformées avec le vecteur vide, le vecteur amiR *SEC14* et le vecteur surexp *SEC14* issues du génotype F83005.5 pour 3 répétitions indépendantes.

Les lettres correspondent aux groupes de moyennes obtenus avec le test de Student-Newman-Keuls en comparant la proportion de colonisation en fonction du vecteur de transformation utilisé (A) et l'accroissement racinaire en fonction des conditions d'inoculation (B).

- c. Extinction et surexpression du gène candidat Medtr7g070480 dans des hairy roots chez l'accèsion sensible F83005.5

L'étude de l'expression du gène Medtr7g070480 codant pour une protéine SEC14 dans les hairy roots du fond génétique F83005.5 a été effectuée de façon identique à celle du fond génétique A17. Chez l'accèsion F83005.5, les racines transgéniques issues des événements de transformation avec le vecteur amiR SEC14 ETB et ETF n'ont pas été retenues pour les inoculations avec *V. alfalfae* car le gène SEC14 n'était pas sous-exprimé par rapport au contrôle correspondant aux racines transgéniques transformées avec le vecteur vide. Les niveaux d'extinction chez F83005.5 sont compris entre -1,1 et -2 (**Figure C-32**). Ces faibles niveaux pourraient s'expliquer par la présence d'un polymorphisme de séquence au niveau de la cible de l'«amiR SEC14 » chez F83005.5 par rapport à A17 (**Figure C-33**). En effet, le choix de l'amiR a été effectué sur le génome de référence A17 et les contraintes de spécificité des amiRs font que l'outil WMD3 a généré des amiRs candidats ciblant des zones qui comportent des polymorphismes de séquences au sein des membres de la famille multigénique des SEC14.

Tous les événements de transformation ont été retenus pour la surexpression du gène candidat avec une variation de l'expression du gène candidat par rapport au contrôle issu de transformations avec le vecteur vide comprise entre 2 et 9 (**Figure C-32**).

Le taux de colonisation par *Va* V31-2 à 7 jours après inoculation des racines transgéniques issues du fond génétique F83005.5 dépend du vecteur utilisé pour la transformation génétique (*P-value* : 0,00701, **Tableau C-15-A**). Le test de comparaison multiple de moyenne de Student-Newman-Keuls met en évidence que les racines transgéniques qui sous-expriment le gène SEC14 ont un taux de colonisation significativement plus faible (73,6%) que celui des racines contrôles transformées avec le vecteur vide (84,5%, *P-value* : 0,0054) et que celui des racines sur-exprimant le gène candidat (88,9%, *P-value* : 0,0005). La différence entre les taux de colonisation des racines contrôles et des racines sur-exprimant le gène SEC14 n'est pas statistiquement significative (*P-value* : 0,2477, **Figure C-34-A**). Ces résultats sont cohérents avec les résultats obtenus avec les hairy roots de l'accèsion A17 : une sur-expression du gène Medtr7g070480 provoque une colonisation plus importante des racines par rapport au témoin alors que la sous-expression de ce gène entraîne une diminution de la colonisation des racines par *Va* V31-2 par rapport au contrôle. La différence non-significative entre les taux de colonisation des racines contrôles et des racines sur-exprimant le gène SEC14 peut être expliquée par la difficulté d'observer un phénotype de sensibilité accrue chez une lignée déjà sensible. Un plus grand nombre de répétitions ou l'utilisation d'un promoteur double 35S auraient peut-être pu mettre en évidence une différence significative de taux de colonisation entre les hairy roots transformées avec le vecteur vide et celles transformées avec le vecteur de surexpression du gène Medtr7g070480.

Tableau C-15 : Tables d'ANOVA des phénotypes colonisation à sept jours après inoculation (A) et accroissement racinaire en sept jours (B) des racines transgéniques transformées avec le vecteur vide, le vecteur amiR SEC14 et le vecteur surexp SEC14 chez F83005.5.

ddl : degré de liberté, colonisation : longueur racinaire colonisée par *Va* V31-2 divisée par la longueur racinaire totale. Accroissement : longueur racinaire à 7 jours après inoculation – longueur racinaire à 0 jours après inoculation. ANOVA réalisée en transformant les données afin de valider les postulats ($\sin^{-1}(\sqrt[2]{\text{Colonisation}/100})$ et $\sqrt[2]{\text{Accroissement}}$). Les valeurs des *P-values* sont indiquées.

A

Sources de variation	ddl	Colonisation
Répétitions	2	3,68.e^{-4***}
Vecteurs	22	7,01.e^{-3***}
Résiduelle	48	

B

Sources de variation	ddl	Accroissement
Répétitions	2	2,45.e^{-4***}
Conditions	1	2,28.e^{-4***}
Vecteurs	2	0,4173
Conditions : Vecteurs	2	0,5637
Résiduelle	97	

C. RÉSULTATS

L'analyse de variance concernant l'accroissement racinaire à 7 jours après inoculation permet de constater que l'accroissement racinaire en condition non-inoculée des racines transformées par les trois vecteurs n'est pas statistiquement différent et qu'il existe un effet de l'inoculation (*P-value* : 0,000228, **Tableau C-15-B**) : quelle que soit la construction utilisée pour la transformation, l'accroissement racinaire diminue après inoculation par *Va* V31-2. (*P-value* : 0,070). Alors qu'un effet subsignificatif de l'interaction entre la condition (inoculée ou contrôle) et le vecteur de transformation (surexpression, sous-expression, vecteur vide) a été observé chez les hairy roots issues du fond génétique A17, cet effet d'interaction n'est pas observé chez les racines transgéniques issues du fond génétique F83005.5 (**Figure C-34-B**).

Les résultats obtenus pour le phénotype de taux de colonisation chez l'accession sensible F83005.5 en condition *in vitro* sont cohérents avec ceux obtenus chez A17 dans ces mêmes conditions et suggèrent que le gène candidat codant pour la protéine *SEC14* serait un gène de sensibilité à *V. alfalfae* V31-2 chez *M. truncatula* : la surexpression du gène Medtr7g070480 entraîne une augmentation du taux de colonisation par *Va* V31-2 alors que son extinction provoque une diminution de ce taux de colonisation par rapport au contrôle.

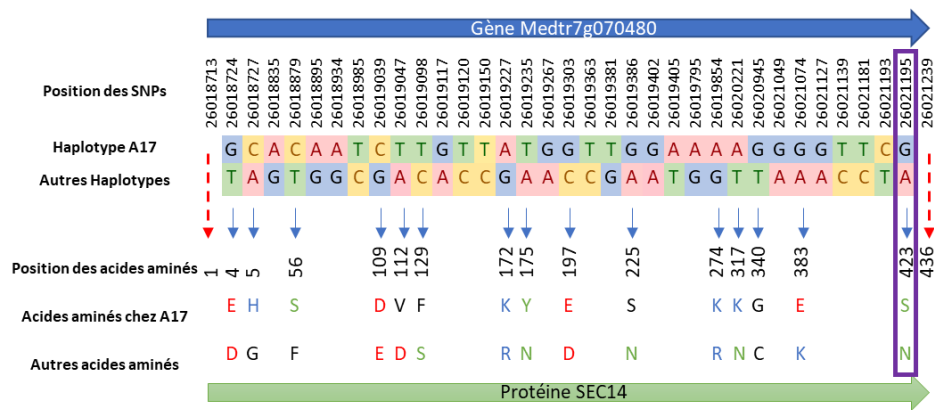


Figure C-35 : Positions des 33 SNPs dans la séquence codante du gène Medtr7g070480 (V4.0) montrant une substitution entre l'accension de référence A17 et au moins une des 246 accessions de la collection MtHapmap et identification des 15 substitutions non synonymes au sein de la protéine SEC14. L'unique substitution non synonyme entre A17 et F83005.5 est encadrée en violet. En rouge, acides aminés acides, en bleu acides aminés basiques, en vert acides aminés polaires, en noir acides aminés non polaires. C : cystine. D : aspartate. E : glutamate. F : phénylalanine. G : glycine. H : histidine. K : lysine. N : asparagine. R : arginine. S : sérine. V : valine.

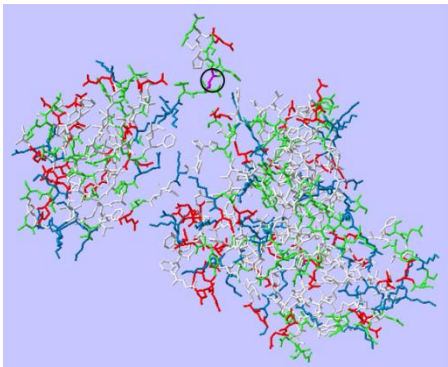


Figure C-36 : Structure tertiaire prédite de la protéine SEC14 encodée par Medtr7g070480 chez A17. La structure tertiaire de la protéine a été prédite à l'aide du logiciel Phyre² (Kelley *et al.*, 2015). L'acide aminé violet encadré en noir représente l'acide aminé 423 : une sérine chez A17 et une asparagine chez F83005.5. En rouge, acides aminés acides, en bleu acides aminés basiques, en vert acides aminés polaires, en gris acides aminés non polaires.

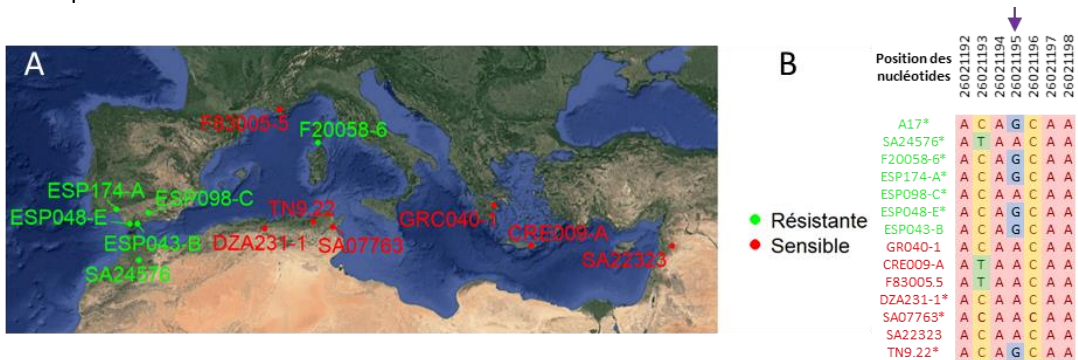


Figure C-37 : Répartition géographique des 14 accessions sélectionnées pour l'étude détaillée des polymorphismes de séquence dans le gène Medtr7g070480 et pour l'étude de son expression racinaire en réponse à l'inoculation par *Verticillium alfalfae* V31-2. En vert, sont représentées les accessions résistantes à *Va* V31-2, en rouge, les sensibles. A. L'accension A17 n'est pas représentée car son origine géographique n'est pas documentée. B. Zoom de l'alignement des séquences des 14 accessions au niveau du SNP 26 021 195 (flèche violette). Les accessions pour lesquelles le gène a été reséqué au laboratoire sont marquées d'un astérisque. Les autres données sont issues du MtHapmap.

4. Etude du polymorphisme de séquence de la protéine SEC14 codé par le gène Medtr7g070480 au sein de la biodiversité naturelle de *Medicago truncatula*

D'après les résultats obtenus sur les racines transgéniques *in vitro*, le gène Medtr7g070480 serait un gène de sensibilité à *V. alfalfae* V31-2 chez *Medicago truncatula*. Afin de tenter d'identifier les raisons des variations de niveau de résistance à *Va* V31-2 chez *Medicago truncatula* liées au gène Medtr7g070480, la séquence du gène et son niveau d'expression racinaire ont été étudiés.

L'analyse de la séquence codante du gène Medtr7g070480 des 246 accessions utilisées pour l'analyse de GWAS a permis de mettre en évidence 105 SNPs, dont 33 substitutions (**Figure C-35**). Parmi les substitutions possibles, quinze mutations sont non-synonymes. L'unique mutation non-synonyme entre A17 et F83005.5 est située au nucléotide 26 021 195. Elle a pour conséquence la substitution d'une sérine par une asparagine au niveau de l'acide aminé 423, au sein du domaine GOLD de la protéine SEC14 (*cf.* **Figure C-12** page 218). Ces deux acides aminés sont polaires et ont la capacité d'établir des liaisons hydrogènes en tant que donneur ou accepteur de proton. Les résidus sérines peuvent également être phosphorylés au niveau de leur groupement hydroxyle (Blom *et al.*, 2004). Néanmoins, d'après l'outil de prédiction en ligne PlantPhos (Lee *et al.*, 2011), cette sérine 423 n'est pas un site de phosphorylation. La structure tertiaire prédite par Phyre² de la protéine SEC14 est présentée **Figure C-36** (Kelley *et al.*, 2015). Ce modèle est basé sur la protéine 2 Sec14-like de l'homme encodée par le gène *SEC14L2*, protéine à 80% identique à la SEC14 encodée par Medtr7g070480 (soit 349 acides aminés identiques sur 436). La localisation plutôt en périphérie du résidu 423 de la protéine pourrait éventuellement jouer un rôle dans des interactions protéine/ligand ou protéine/protéine.

L'analyse des séquences codantes du gène Medtr7g070480 chez 14 accessions naturelles de *Medicago truncatula* réparties le long du bassin Méditerranéen et choisies en fonction de leur résistance ou sensibilité à *Verticillium alfalfae* V31-2 (**Figure C-37-A**) a été réalisée à partir de données de séquençage et des données du MtHapmap. Il existe notamment des polymorphismes au niveau du nucléotide 1258 de la séquence codante de Medtr7g070480 (soit le nucléotide 26 021 195 du chromosome 7 de *Medicago truncatula*). Cependant, ce polymorphisme seul n'explique pas les différents phénotypes des quatorze accessions : les six autres accessions sensibles ne possèdent pas toutes l'adénine de F83005.5 et les six accessions résistantes n'ont pas toutes la guanine d'A17 (**Figure C-37-B**).

La distribution des MSS corrigés des 246 accessions de *Medicago truncatula* dont la réponse à l'inoculation par *Va* V31-2 a été obtenue pour le GWAS a ensuite été représentée en fonction de la nature de l'acide aminé 423 (**Figure C-38**). Les 54 accessions pour lesquelles le résidu 423 de la SEC14 est une sérine telle qu'A17 sont en moyenne significativement moins malades que celles qui possèdent une asparagine (MSS respectivement de 1,694 et 2,435, *P-value* du test de Student : $3,23 \cdot 10^{-6}$). Cette

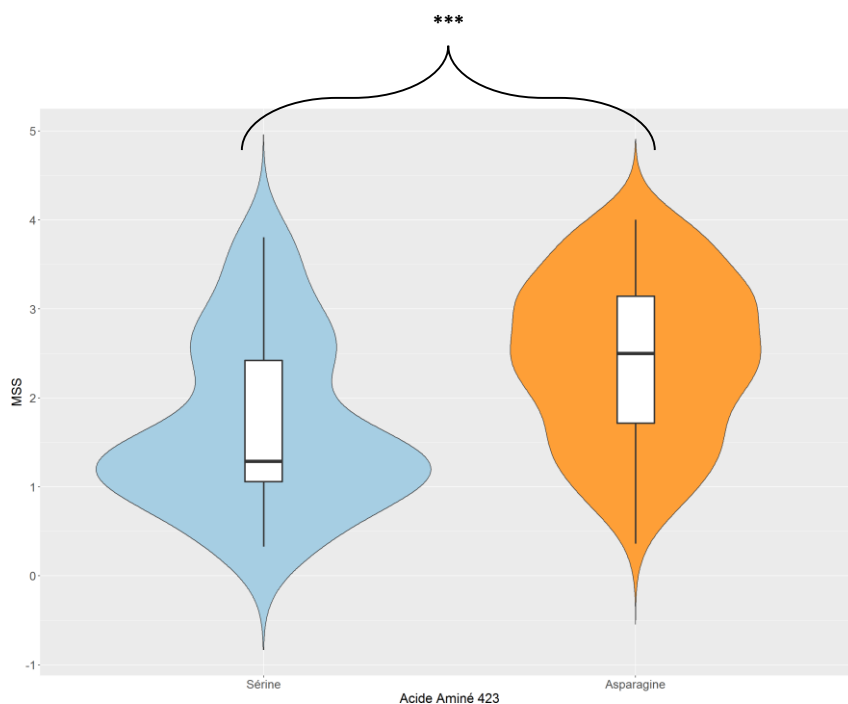


Figure C-38 : Distribution du MSS corrigé moyen des 203 accessions du projet Hapmap dont la réponse à *Verticillium alfalfae* V31-2 a été évaluée pour l'étude GWAS en fonction de l'acide aminé 423 de la protéine SEC14.

Parmi les 246 accessions dont la réponse à *Va* V31-2 a été évaluée, une bonne qualité de séquençage à ce SNP n'est disponible que pour 203 accessions.

Les accessions présentant une sérine au niveau de l'acide aminé 423 ont un MSS significativement plus faible que celles présentant une asparagine (P -value du test de Student : $3,23 \cdot 10^{-6}$).

Tableau C-16 : SNPs pour lesquels le déséquilibre de liaison R^2 avec le SNPs 26021195 est supérieur à 0,7.

SNPs	R^2
26021883	0,9924
26022430	0,9707
26021887	0,9643
26021891	0,9635
26021882	0,9632
26021879	0,9629
26021865	0,9616
26021867	0,9612
26021849	0,9607
26021827	0,9601
26022048	0,9397
26021802	0,9309
26021825	0,9304

SNPs	R^2
26021814	0,9265
26022055	0,9106
26021930	0,9101
26021816	0,8970
26021986	0,8866
26021789	0,8772
26021976	0,8610
26021968	0,8576
26021790	0,8404
26021769	0,7743
26021768	0,7313
26021771	0,7231

C. RÉSULTATS

substitution d'acide aminé explique 18,5% du phénotype observé (la différence de score de symptômes de 0,741 entre les géotypes les plus résistants (0) à et les géotypes les plus sensibles (4) correspond à une différence de 18,5%).

La substitution du résidu 423 sérine de la protéine SEC14 par une asparagine semble conférer un meilleur niveau de résistance. Ce résidu correspond au nucléotide 26 021 195 du chromosome 7 du génome de *Medicago truncatula*. Néanmoins, il existe un fort déséquilibre de liaison ($R^2 > 0,7$) entre ce nucléotide et 25 autres nucléotides tous en aval de la séquence codante du gène Medtr7g070480 (**Tableau C-16**). Nous ne pouvons donc pas affirmer avec certitude que la substitution d'une sérine par une asparagine est la cause d'une meilleure résistance à *Va* V31-2 chez *Medicago truncatula*. Une étude structurale de cette protéine afin d'identifier des sites de liaison ou d'interaction protéine/ligand ainsi que l'identification de ses partenaires pourrait valider le rôle de ce résidu dans la résistance à *Verticillium alfalfae* V31-2 chez *Medicago truncatula*.

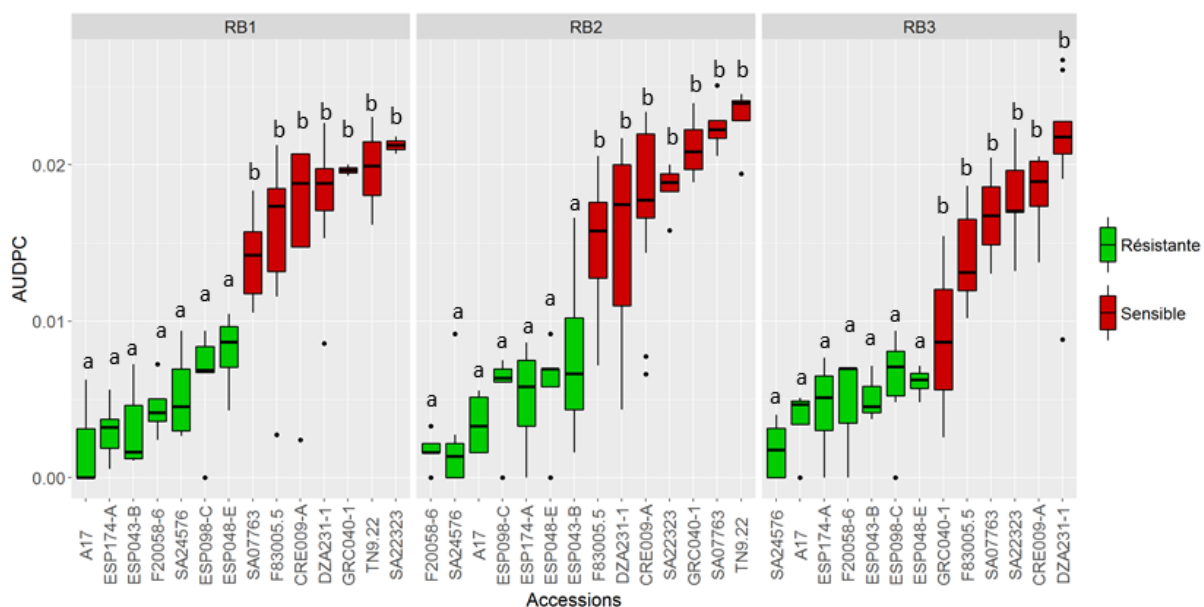


Figure C-39 : Distribution des AUDPC des 14 lignées pour 3 répétitions biologiques.

Le suivi des symptômes a été réalisé pendant 32 jours après inoculation par *Va* V31-2. Entre 3 et 10 plantes par accession ont été utilisées. L'ANOVA met en évidence un effet accession sur le phénotype AUDPC (P -value : $7,45.e^{-10}$). Le test de Student-Newman-Keuls permet de distinguer un groupe d'accessions résistantes (a, en vert) et un groupe d'accessions sensibles (b, en rouge).

Tableau C-17 : Table d'ANOVA de la moyenne des AUDPC par répétition et par accession 32 jours après inoculation par *Verticillium alfalfae* V31-2.

ddl : degré de liberté. AUDPC : Area Under the Disease Progress Curve. ANOVA réalisée sans transformation de données afin de valider les postulats. Les valeurs des P -values sont indiquées.

Sources de variation	ddl	AUDPC
Répétitions	2	0,21
Accessions	13	$7,45.e^{-10***}$
Résiduelle	25	

5. Etude de l'expression du gène candidat *SEC14* en réponse à l'inoculation par *Va* V31-2 dans un panel d'accessions sensibles et résistantes

L'expression du gène candidat Medtr7g074080 codant pour la SEC14 a été comparée par qRT-PCR à 0 et 1 jour après inoculation par *Va* V31-2 respectivement notés 0 dpi et 1 dpi, en conditions contrôle et inoculée, au sein du panel de 14 accessions naturelles de *Medicago truncatula* choisies en fonction de leur résistance ou sensibilité à *Va* V31-2 (**Figure C-37**). Trois répétitions biologiques ont été effectuées. La résistance à *Va* V31-2 ayant lieu au sein de la racine de *M. truncatula* et le gène Medtr7g074080 étant exprimé dans un pool de racines inocuées à 4, 8 et 24 heures après inoculation par *Va* V31-2 (Toueni *et al.*, 2016), cette étude a été réalisée au sein des racines un jour après inoculation.

Pour chacune des accessions, entre 12 et 20 plantes ont été nécessaires par répétition biologique pour réaliser cette étude : des pools de racines de trois plantes par accession ont été prélevés à 0 dpi et 1 dpi en condition contrôle et inoculée par *Va* V31-2. Le reste des plantes a été utilisé afin de suivre le développement des symptômes de flétrissement pendant 32 jours. La **Figure C-39** montre la distribution des AUDPC par répétitions pour chacune des accessions. L'ANOVA met en évidence un effet de l'accession sur l'AUDPC sans effet répétition et le test de comparaisons multiples de moyenne de Student-Newman-Keuls permet de distinguer les deux groupes d'accessions sensibles et résistantes ($P\text{-value} : 7,45.e^{-10}$, **Tableau C-17**).

Outre le suivi du développement des symptômes, et pour témoigner du bon déroulement de l'inoculation, l'expression de gènes de réponse aux stress biotiques tel que le gène codant pour la protéine Pathogenesis-Related4 -PR4- Medtr2g099470 induit par la voie de l'acide jasmonique, ou encore les gènes codant pour la protéine Pathogenesis-Related5 -PR5- Medtr1g062590 et Phenylalanine Ammonia-Lyase -PAL- Medtr1g064090 induits par la voie de l'acide salicylique (Gao *et al.*, 2007)) a été étudiée par qRT-PCR. À 0 dpi, il n'existe pas de différences significatives d'expression de ces gènes entre les 14 accessions sensibles et résistantes. En revanche, le ΔCt des gènes PR4, PAL et PR5 est dépendant de la répétition biologique ($P\text{-values}$ respectivement de $5,86.e^{-5}$, $2,90.e^{-4}$ et $1,36.e^{-5}$, **Tableau C-18-A**).

Un jour après inoculation, l'ANOVA sur le niveau d'expression des gènes marqueurs exprimé en valeur relative par rapport au contrôle non inoculé ($\Delta\Delta Ct$) montre un effet répétition important pour les gènes PAL et PR5, et un effet accession pour le gène PAL (**Tableau C-18-B**). Les fold changes obtenus pour chacun des gènes ainsi que leur écart-type sont présentés **Tableau C-19** : les fold changes des gènes induits (fold change > 1) sont représentés en vert et les gènes réprimés (fold change < -1) sont représentés en rouge. On constate qu'il n'y a aucune induction ou répression des gènes PR4, PAL et PR5 pour les accessions F20058-6, ESP098-C, ESP043-B, F83005.5, et SA22323. Ceci n'est pas inattendu, l'étude de l'expression de ces gènes a été réalisée un jour après inoculation, alors que la

Tableau C-18 : Tables d'ANOVA du niveau d'expression des gènes de réponse aux stress biotiques (PR4, PAL, PR5) par répétition et par accession au moment de l'inoculation par *Verticillium alfalfae* V31-2 (0 dpi, A) et à 1 dpi (B).

Le niveau d'expression des gènes à 0 dpi est défini par $\Delta Ct = (Ct_{\text{gène}} - Ct_{\text{standard}})$. Le niveau d'expression des gènes à 1 dpi est défini par $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{gène}} - Ct_{\text{standard}})_{\text{inoculé}} - (Ct_{\text{gène}} - Ct_{\text{standard}})_{\text{contrôle}}$.

PR4 : Medtr2g099470. PAL : Medtr1g064090. PR5 : Medtr1g062590. ddl : degré de liberté. ANOVAs réalisées sans transformation de données afin de valider les postulats. Les valeurs des *P-values* sont indiquées.

A

Sources de variation	ddl	PR4	PAL	PR5
Répétitions	2	5,86.e-5***	2,90.e-4***	1,36.e-5***
Accessions	13	0,809	0,950	0,0648.
Résiduelle	25			

B

Sources de variation	ddl	PR4	ddl	PAL	ddl	PR5
Répétitions	2	0,108	2	3,098.e-4***	2	0,022*
Accessions	13	0,993	13	0,0305	13	0,1922
Résiduelle	23		24		21	

Tableau C-19 : Analyse de l'expression de gènes marqueurs de stress biotique en réponse à l'inoculation par *Verticillium alfalfae* V31-2 dans les racines de 14 accessions sensibles et résistantes de *Medicago truncatula*.

Fold change moyen de l'expression des gènes dans les racines inoculées par *Va* V31-2 par rapport au contrôle non inoculé à un jour après inoculation et écart-type pour trois répétitions biologiques indépendantes. Les gènes activés significativement suite à l'inoculation par *Va* V31-2 sont en vert (Fold change>1), les gènes réprimés significativement en rouge (Fold change<-1).

Accession	MSS	Phénotype en réponse à <i>Va</i> V31-2	PR4 (Medtr2g099470)	PR5 (Medtr1g062590)	PAL (Medtr1g064090)
A17	0,74 ± 0,20	Résistante	2,16 ± 1,95	5,47 ± 2,43	93,57 ± 64,17
SA24576	0,83 ± 0,17	Résistante	0,30 ± 2,71	47,11 ± 17,01	-0,12 ± 2,72
F20058-6	1,10 ± 0,11	Résistante	10,15 ± 10,05	2,75 ± 14,48	9,31 ± 11,22
ESP174-A	1,12 ± 0,22	Résistante	0,59 ± 2,16	1,86 ± 2,02	-1,76 ± 0,39
ESP098-C	1,21 ± 0,13	Résistante	1,88 ± 5,11	5,36 ± 5,33	-0,24 ± 11,55
ESP048-E	1,44 ± 0,06	Résistante	1,05 ± 2,39	1,15 ± 0,07	-1,36 ± 2,74
ESP043-B	1,56 ± 0,05	Résistante	0,19 ± 1,49	3,42 ± 4,35	-0,52 ± 1,74
GR040-1	3,72 ± 0,21	Sensible	1,44 ± 0,40	31,26 ± 28,49	9,82 ± 5,70
CRE009-A	3,71 ± 0,07	Sensible	2,52 ± 2,94	15,42 ± 10,46	9,37 ± 9,03
F83005.5	3,53 ± 0,28	Sensible	0,10 ± 2,16	3,42 ± 5,64	-1,25 ± 2,01
DZA231-1	3,67 ± 0,10	Sensible	1,90 ± 2,01	3,51 ± 1,86	11,68 ± 8,46
SA07763	3,90 ± 0,03	Sensible	0,81 ± 1,13	9,14 ± 5,41	-0,48 ± 1,15
SA22323	3,97 ± 0,26	Sensible	-1,60 ± 4,68	-10,92 ± NA	-1,33 ± 3,00
TN9.22	4,00 ± 0,00	Sensible	-1,68 ± 0,54	-2,32 ± NA	-1,80 ± 0,60

réponse de ces gènes aux stress biotiques est généralement plus visible trois jours après application du stress (Gao *et al.*, 2007). Il n'existe pas non plus de patron d'expression de ces gènes en fonction du phénotype de résistance ou de sensibilité à *Va* V31-2. Néanmoins, la combinaison des données de suivi de symptômes et des données d'expression des gènes nous permet d'affirmer que l'inoculation s'est bien déroulée.

Le niveau d'expression du gène Medtr7g074080 (SEC14) à 0 dpi n'est pas significativement différent entre accessions (**Tableau C-20-A**). À 1 dpi, le fold change de l'expression du gène SEC14 n'est pas dépendant de l'accession ni du caractère résistant ou sensible de l'accession (**Tableau C-20-B et C**). Comme pour le niveau d'expression des gènes de réponses au stress biotique, il existe une grande variabilité du niveau d'expression en fonction des répétitions (**Figure C-40**).

Le phénotype résistant ou sensible de l'accession n'est pas dû à une différence de niveau d'expression du gène de la SEC14 avant inoculation par *Va* V31-2 ou à 1 dpi. Différentes hypothèses sont donc envisageables, soit la différence du niveau d'expression est plus tardive, soit il existe une mutation au sein de la séquence protéique qui modifierait la fonction de la protéine ou sa stabilité. Si la mutation de l'acide aminé 423 de la protéine SEC14 entre les accessions A17 et F85005.5 peut expliquer nos résultats de validation fonctionnelle, elle n'est pas la seule responsable des différents niveaux de résistance chez ce panel : les accessions résistantes SA24576 et ESP098-C ont un résidu asparagine comme l'accession sensible F83005.5, et l'accession sensible TN9.22 a un résidu sérine comme l'accession résistante A17 (**Figure C-37-B**, page 264). Ces différences de niveaux de résistance peuvent avoir pour origine une autre mutation au niveau du gène Medtr7g074080 ou bien une mutation dans un autre gène impliqué dans la résistance à *Va* V31-2 chez *Medicago truncatula*.

C. RÉSULTATS

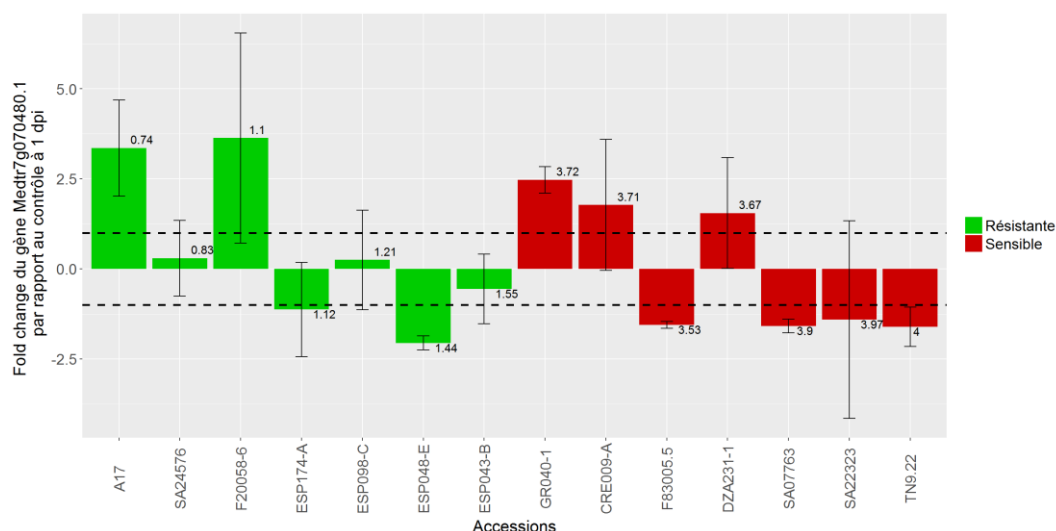


Figure C-40 : Fold change de l'expression du gène *SEC14* (Medtr7g070480) en réponse à l'inoculation par *Verticillium alfalfae* V31-2 dans les racines de 7 accessions sensibles et résistantes de *Medicago truncatula* à un jour après inoculation.

Les accessions sont classées selon l'ordre croissant du MSS moyen sur les trois répétitions biologiques indépendantes dont la valeur est indiquée au dessus de l'histogramme. Les folds change moyens de l'expression des gènes dans les racines inoculées par *Va* V31-2 par rapport au contrôle non inoculé à un jour après inoculation et les écart-types sont présentés pour trois répétitions biologiques indépendantes. Les résultats concernant les accessions résistantes sont représentés en vert, les sensibles en rouge.

Tableau C-20 : Tables d'ANOVA du niveau d'expression du gène *SEC14* (Medtr7g070480) par accession au moment de l'inoculation par *Verticillium alfalfae* V31-2 (0 dpi, A), à 1 dpi (B) et par phénotype de réponse à *Verticillium alfalfae* V31-2 à 1 dpi (C).

Le niveau d'expression des gènes à 0 dpi est défini par $\Delta Ct = (Ct_{SEC14} - Ct_{standard})$. Le niveau d'expression des gènes à 1 dpi est défini par le fold change $2^{-\Delta\Delta Ct}$ où $\Delta\Delta Ct = (Ct_{SEC14} - Ct_{standard})_{inoculé} - (Ct_{SEC14} - Ct_{standard})_{contrôle}$.

ddl : degré de liberté. ANOVAs réalisées sans transformation de données afin de valider les postulats. Les valeurs des *P-values* sont indiquées.

A

Sources de variation	ddl	ΔCt
Répétitions	2	0,305
Accessions	13	0,882
Résiduelle	24	

B

Sources de variation	ddl	Fold change
Répétitions	2	0,110
Accessions	13	0,055.
Résiduelle	24	

C

Sources de variation	ddl	Fold change
Répétitions	2	0,196
Phénotypes	1	0,654
Résiduelle	36	

6. Bilan des expériences de validation fonctionnelle

Par définition, un gène de sensibilité est nécessaire pour la maladie, la réduction de son expression doit rendre l'hôte plus résistant.

Les expériences de validation fonctionnelle sur hairy roots ont mis en évidence le fait que l'extinction de l'expression du gène Medtr7g070480 codant pour une protéine SEC14 chez les lignées sensible F83005.5 et résistante A17 diminuait leur colonisation racinaire par *Verticillium alfalfae* V31-2 sept jours après inoculation. La surexpression de l'allèle SEC14 d'A17 dans le fond génétique A17 entraîne une augmentation de cette colonisation racinaire.

Après inoculation, les racines transgéniques issues du fond génétique A17 sous-exprimant la SEC14 croissent plus en sept jours que celles surexprimant ce gène.

Un autre gène de sensibilité dont l'altération entraîne une résistance quantitative a déjà été cloné. Il s'agit du gène *pi21* conférant une résistance à la pyriculariose (*Magnaporthe oryzae*) chez le riz (*Oryza sativa*)(Fukuoka *et al.*, 2009).

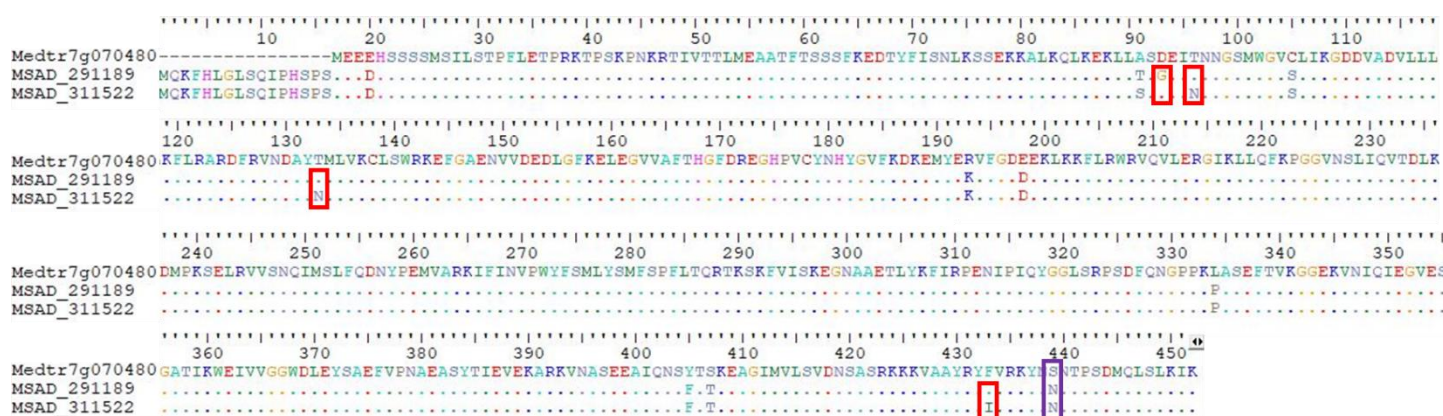


Figure C-41 : Alignement des séquences protéiques codées par Medtr7g070480 de *Medicago truncatula* et de deux protéines codées par les allèles MSAD_291189 et MSAD_311522 du gène orthologue à Medtr7g070480 chez *Medicago sativa* CALD.

Le polymorphisme de séquence de l'acide aminé 439 présent entre A17 et F83005.5 possédant respectivement une sérine (S) et une asparagine (N) est également présent avec le gène orthologue à Medtr7g070480 chez *Medicago sativa* dont les deux allèles identifiés possèdent une asparagine (encadré en violet).

Les polymorphismes entre les deux allèles MSAD_291189 et MSAD_311522 sont encadrés en rouge.

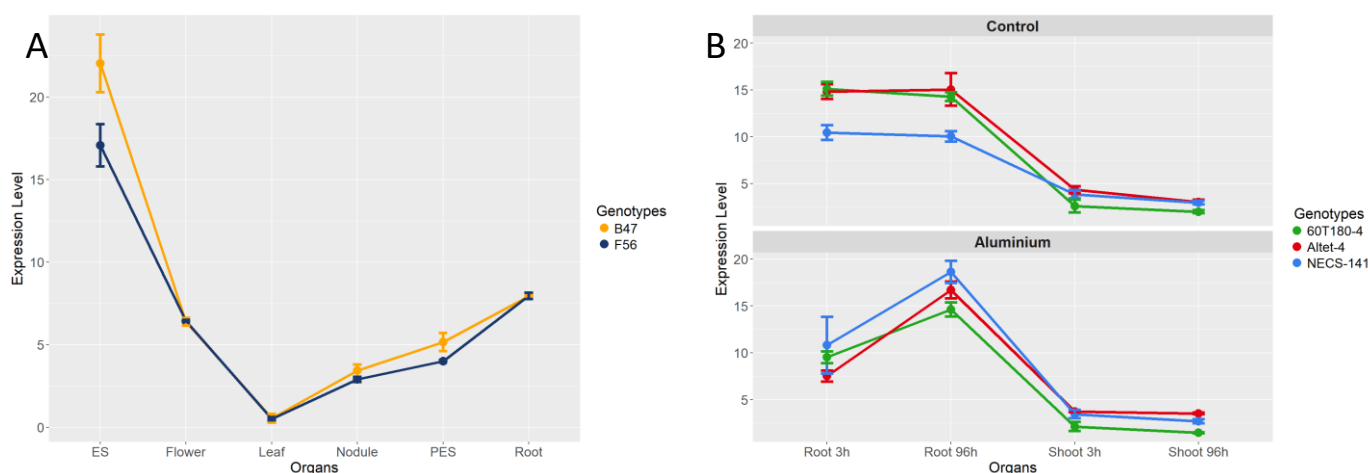


Figure C-42 : Expression du gène orthologue à Medtr7g070480 MSAD_291189 chez différents génotypes de *Medicago sativa*, dans différents organes et dans différentes conditions.

A. Expression de MSAD_291189 dans différents organes de *Medicago sativa* ssp. *sativa* B47 et *Medicago sativa* ssp. *falcata* F56 (O'Rourke et al., 2014).

ES : Elongating Stem Internodes. Flower : Developing Flowers. Leaf : Mature Leaf. Nodule : Nitrogen Fixing Nodules. PES : Post-Elongating Stem Internodes. Root : Whole Root.

B. Expression de MSAD_291189 dans les racines et les parties aériennes des génotypes 60T180-4, Altet-4 et NECS-141 en condition contrôle et traitée par 100µM d'aluminium à 3h et 96h après traitement (Monteros et al. unpublished).

Le niveau d'expression des gènes a été normalisé par la médiane des RPKM (Reads Per Kilobase Million), les barres d'erreur représentent l'écart-type des valeurs d'expressions du gène issues de trois répétitions biologiques.

7. Recherche d'orthologues de Medtr7g070480 chez la luzerne cultivée *Medicago sativa*

Après la validation du rôle du gène Medtr7g070480 codant pour une protéine SEC14 dans la résistance à *Verticillium alfalfae* V31-2 chez *Medicago truncatula*, des gènes orthologues ont été recherchés chez l'espèce à intérêt agronomique, écologique et économique *Medicago sativa*.

Il existe un site dédié aux données génétiques et génomiques de la luzerne où l'on trouve notamment la version V1.0 du génome de CALD (Cultivated Alfalfa at the Diploid Level) ainsi qu'un atlas d'expression de gènes de luzerne construit à partir de données provenant de diverses expériences (<https://www.alfalfatoolbox.org/>). Initialement, les populations de CALD ont été développées afin de faciliter les études génétiques, elles sont issues d'un croisement entre *Medicago sativa* spp. *sativa* (4X) et *Medicago sativa* spp. *falcata* (2X). L'hybride obtenu (2X) a été utilisé comme parent femelle dans un nouveau croisement avec *Medicago sativa* spp. *falcata* (2X). Les hybrides F1 ont ensuite servi de parent mâle dans une série de rétrocroisements afin de générer les populations CALD (Bingham and McCoy, 1979; Brummer *et al.*, 1991). L'individu CALD sélectionné a été cloné en 2015 à l'Université du Minnesota et fait également parti du projet MtHapmap sous la dénomination HM342.

La recherche de gènes orthologues a mis en évidence l'existence de deux orthologues MSAD_291189 et MSAD_311522 présentant respectivement 97,71 et 97,94% d'homologie à Medtr7g070480. Ces deux gènes encodent des protéines d'une longueur de 452 acides aminés qui sont à 94% homologues à la protéine encodée par Medtr7g070480. Cependant, le génome de CALD disponible sur ce site n'est pas assemblé, et une visualisation des scaffolds de ce génome a mis en évidence le fait que la portion du génome contenant MSAD_291189 et MSAD_311522 était encadrée par deux marqueurs SNPs identiques : les marqueurs TP53858 et TP100951 (marqueurs distants de 200 kb, décrits par (Li *et al.*, 2014c)). De plus, le génome de CALD est fortement hétérozygote, on peut donc supposer que MSAD_291189 et MSAD_311522 sont deux allèles présentant quatre polymorphismes d'un unique gène orthologue à Medtr7g070480. Le polymorphisme de séquence de l'acide aminé 439 présent entre A17 et F83005.5 possédant respectivement une sérine (S) et une asparagine (N) est également présent chez ces deux allèles qui possèdent une asparagine (**Figure C-41**). Au vu de ce résultat, une évaluation de la réponse à l'inoculation par *Verticillium alfalfae* V31-2 de CALD (HM342) serait intéressante.

La **Figure C-42** présente le profil d'expression du gène MSAD_291189 dans différentes conditions expérimentales. Les différentes banques d'ARN ont été obtenues par RNA-seq et pour chacune des conditions trois répétitions biologiques ont été réalisées. L'expression du gène MSAD_291189 a été analysée au sein de différents organes de *Medicago sativa* ssp. *sativa* B47 (tétraploïde) et *Medicago sativa* ssp. *falcata* F56 (diploïde) (**Figure C-42-A**). Ce gène est exprimé dans tous les organes testés à

C. RÉSULTATS

l'exception des feuilles matures. Les niveaux d'expression les plus élevés sont observés dans les entrenœuds en élongation et dans une moindre mesure au niveau des racines de ces plantes (O'Rourke *et al.*, 2014). L'expression du gène au niveau des parties aériennes et des racines a également été étudiée chez trois génotypes différents 60T180-4, Altet-4 (tous deux tolérants au stress aluminique) et NECS-141 (sensible au stress aluminique) en condition contrôle et en condition stressée par 100 μ M d'aluminium 3h et 96h après traitement (**Figure C-42-B**). MSAD_291189 est exprimé dans les racines des trois génotypes et on peut également remarquer une augmentation de cette expression racinaire 96h après application du stress aluminique quelque soit le niveau de tolérance à cet élément. L'expression de MSAD_291189 au niveau des parties aériennes en condition contrôle et traitée est basse voir nulle pour chacun des génotypes (Monteros *et al.* unpublished).

IV. Vers la validation fonctionnelle de gènes candidats à la résistance à la verticilliose dans des pathosystèmes hétérologues

Compte tenu de l'absence de mutants dans les gènes d'intérêt dans les phases initiales de ces travaux de thèse et des difficultés décrites pour la transformation génétique de *Medicago truncatula* (Trinh *et al.*, 1998; Chabaud *et al.*, 2003; Crane *et al.*, 2006), la validation fonctionnelle des gènes candidats pour la résistance à *Verticillium alfalfae* V31-2 que nous avons identifiés par génétique d'association chez *M. truncatula* a été envisagée chez des systèmes hétérologues tels que les pathosystèmes impliquant *Verticillium alfalfae* en interaction avec les modèles végétaux *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana* sp. et *Lotus japonicus*. Cette approche a été motivée par le fait que différentes collections de mutants existent chez *Arabidopsis thaliana* (<https://www.arabidopsis.org/portals/mutants/>) et *Lotus japonicus* (<https://lotus.au.dk/>), et que *Nicotiana benthamiana* et certaines accessions de *Nicotiana tabacum* sont connues pour leur capacité de transformation stable (An *et al.*, 1986; Clemente, 2006). De telles validations fonctionnelles de gènes candidats pour la réponse de plantes à des pathogènes ont déjà été utilisées avec succès comme par exemple les gènes *GbVDR6* et *GhPMEI3* du coton (*Gossypium barbadense*, *Gossypium hirsutum*) améliorant la résistance quantitative à *Verticillium dahliae* (Yang *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2018).

Pour cela, il a été nécessaire (i) de vérifier que ces modèles végétaux sont des plantes hôtes de l'espèce *V. alfalfae* en testant la pathogénicité de la souche *Va* V31-2 et le cas échéant, (ii) de caractériser ces nouveaux pathosystèmes encore jamais décrits, en identifiant si possible des lignées sensibles et résistantes à *Va* V31-2. Dans un second temps, les orthologues des gènes candidats chez les différentes espèces végétales d'intérêt et des mutants dans ces gènes au sein des collections disponibles ont été recherchés.

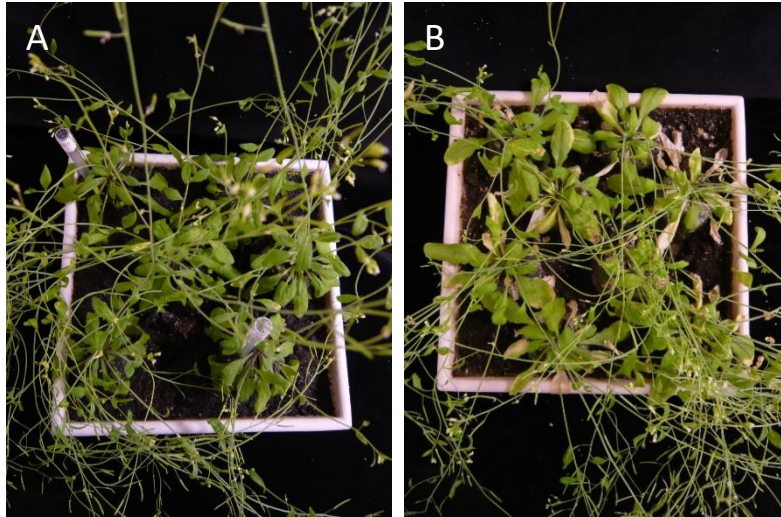


Figure C-43 : *Arabidopsis thaliana* Col-0 à 26 jours après inoculation racinaire en condition contrôle (A) et inoculées par *Verticillium alfalfae* V31-2 (B).

Les symptômes causés par *Va* V31-2 sont l'apparition de chloroses foliaires et une floraison précoce d'*Arabidopsis thaliana* Col-0.

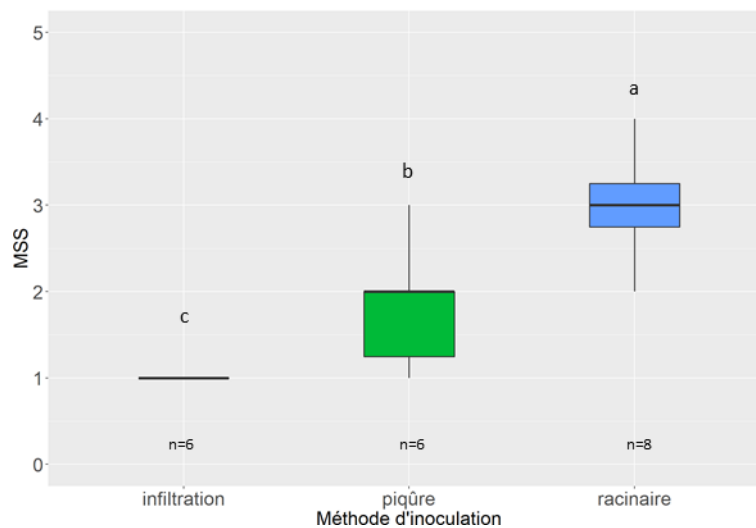


Figure C-44 : Evaluation de la pathogénicité de *Verticillium alfalfae* V31-2 et de trois méthodes d'inoculation chez *Arabidopsis thaliana* Col-0 pour deux répétitions indépendantes 26 jours après inoculation.

L'échelle de symptômes utilisées est la suivante : 0 : aucune feuille chlorosée, 1 : entre 0 et 20% de feuilles chlorosées, 2 : entre 20 et 40% de feuilles chlorosées, 3 : entre 40 et 60% de feuilles chlorosées, 4 : entre 60 et 80% de feuilles chlorosées et 5 : entre 80 et 100% des feuilles chlorosées (Veronese *et al.*, 2003). Le MSS (Maximum Symptom Score) correspond au score de symptômes à 26 dpi.

Le MSS des plantes inoculées par *Va* V31-2 est significativement différent en fonction des méthodes d'inoculation ($P\text{-value} : 7,32.e^{-5}$). Les lettres correspondent aux groupes de moyennes obtenus avec le test de Student-Newman-Keuls en comparant le MSS par différentes méthodes d'inoculation.

n : nombre de plantes inoculées par répétition indépendante.

1. Etude de la pathogénicité de *Verticillium alfalfae* V31-2 chez d'autres modèles végétaux

a. *Arabidopsis thaliana*

L'étude de pathogénicité d'*Arabidopsis thaliana* a été réalisée sur l'accession Col-0. En effet, c'est dans ce fond génétique qu'existent des banques de mutants, la transformation génétique stable peut également être effectuée à partir de cette accession et elle est sensible à différentes souches défoliantes et non défoliantes de *Verticillium* (Veronese *et al.*, 2003; Häffner *et al.*, 2010; Maldonado-Gonzalez *et al.*, 2015). Trois méthodes différentes d'inoculation ont été utilisées : inoculation racinaire et inoculation foliaire par piqûre ou infiltration. L'inoculation racinaire est classiquement utilisée dans la littérature (*Verticillium* sp. est un pathogène racinaire, (Veronese *et al.*, 2003; Häffner *et al.*, 2010; Maldonado-Gonzalez *et al.*, 2015)) alors que les inoculations foliaires chez *Verticillium* sp. n'ont pas encore été décrites même si d'autres pathogènes racinaires ont déjà été inoculés de cette façon (comme par exemple *Rasltonia solanacearum* chez *Nicotiana tabacum* (Maimbo *et al.*, 2010)). Nous avons testé l'inoculation foliaire par pique et infiltration car une validation fonctionnelle de nos gènes candidats par VIGS a été envisagée (Burch-Smith, 2006).

L'échelle de notation utilisée est identique à celle publiée par (Veronese *et al.*, 2003) (2003) avec des scores de symptômes allant de 0 à 5 en fonction de la proportion croissante de feuilles chlorosées sur la plante. La **Figure C-43** présente les chloroses observées sur les feuilles constituant la rosette de Col-0. Durant le suivi des symptômes, une floraison précoce des plantes inoculées par *Va* V31-2 a également été observée par rapport au contrôle (les plantes inoculées ont fleuri cinq jours avant les plantes témoins). Des symptômes similaires ont déjà été décrits chez *Arabidopsis thaliana* après inoculation par *Verticillium longisporum* 43 et alors qu'une floraison tardive est observée après inoculation par *Verticillium dahliae* VdBob70 (Veronese *et al.*, 2003; Häffner *et al.*, 2010). La **Figure C-44** présente les résultats obtenus 26 jours après inoculation par *Va* V31-2 : l'inoculation des plantes provoque l'apparition de chloroses sur les feuilles d'*Arabidopsis thaliana* pour toutes les méthodes d'inoculation. Néanmoins, toutes les méthodes d'inoculation ne sont pas équivalentes (*P-value* : $7,32.e^{-5}$) : l'inoculation racinaire est la plus efficace (MSS moyen de 3 à 26 dpi), suivie par l'inoculation foliaire par infiltration (1,83) et par piqûre (1). Ceci est tout à fait logique puisque *Va* V31-2 est un pathogène racinaire.

L'accession Col-0 peut être considérée comme une accession intermédiaire (ni résistante, ni sensible) étant donné qu'au maximum 60% de ses feuilles présentent des chloroses. Cette accession est moins sensible à *Verticillium alfalfae* *Va* V31-2 qu'à *Verticillium dahliae* VdBob70 où le MSS atteint 80% des feuilles (Veronese *et al.*, 2003).

C. RÉSULTATS

Afin d'utiliser ce pathosystème pour de la validation fonctionnelle de gènes candidats en systèmes hétérologues, un crible doit-être effectué afin d'obtenir des accessions sensibles et résistantes à *Verticillium alfalfae* V31-2. Les accessions C-24, Aa-0, Bl-1, Bla-6, Cal-0, Co-1, Co-2, Ler-0, Ll-0 pourraient être utilisées pour ce crible, car elles présentent des niveaux de résistance différents à *Verticillium dahliae* VdBob70 (Veronese *et al.*, 2003).

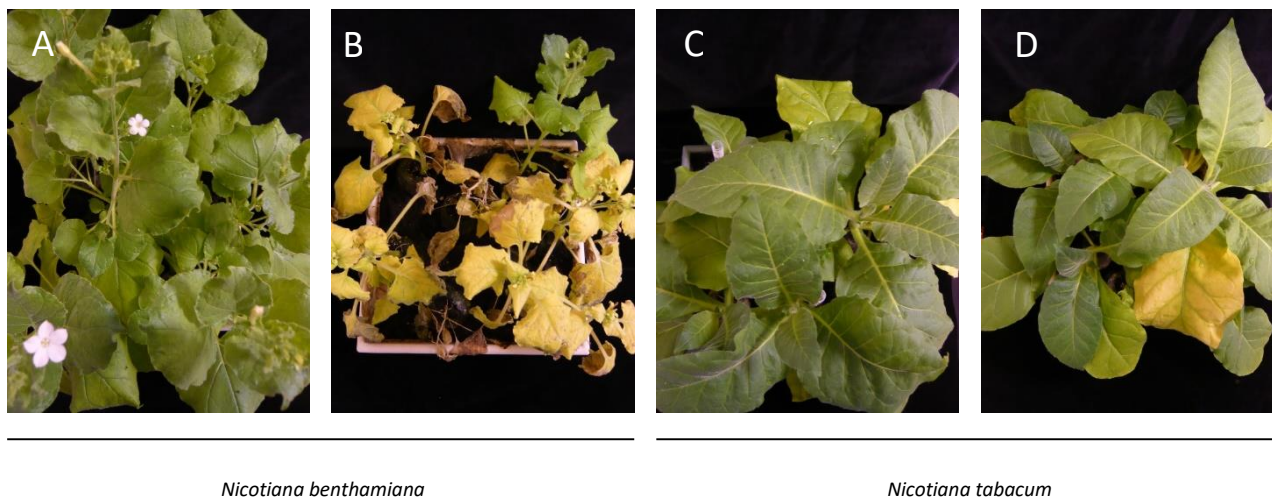


Figure C-45 : *Nicotiana benthamiana* et *Nicotiana tabacum* 46-8 à 26 jours après inoculation racinaire en condition contrôle (A et C) et inoculées par *Verticillium alfalfae* V31-2 (B et D).
 Les symptômes causés par Va V31-2 sont l'apparition de chloroses et un flétrissement foliaire.

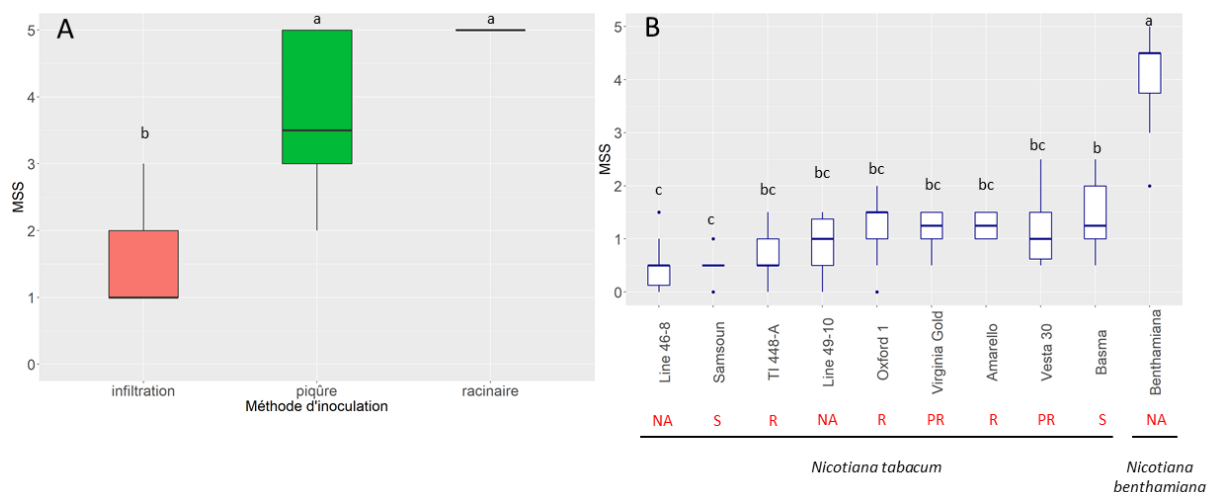


Figure C-46 : Evaluation de la pathogénicité de *Verticillium alfalfae* V31-2 chez *Nicotiana* sp.

A. MSS de *Nicotiana benthamiana* obtenus à 26 jours après inoculation pour trois méthodes d'inoculation et deux répétitions indépendantes avec 8 plantes par méthode d'inoculation et par répétition. Ce MSS dépend de la méthode d'inoculation utilisé (P -value : $5,27 \cdot 10^{-6}$), les lettres correspondent aux groupes de moyennes obtenus avec le test de Student-Newman-Keuls en comparant le MSS par méthodes d'inoculation.

B. Evaluation de la pathogénicité de Va V31-2 chez *Nicotiana tabacum* et *Nicotiana benthamiana* par inoculation racinaire pour deux répétitions indépendantes à 28 jours après inoculation pour 10 plantes par accession par répétition. Le MSS dépend de l'accession (P -value : $< 2 \cdot 10^{-16}$), les lettres correspondent aux groupes de moyennes obtenus avec le test de Student-Newman-Keuls en comparant le MSS par accession. Les lettres en rouge correspondent au niveau de résistance des accessions de *Nicotiana tabacum* à *Verticillium dahliae* (McLeod and Thomson, 1959; Wright, 1968).

R : résistant. S : sensible, PR : partiellement résistant, NA : non évalué.

b. *Nicotiana* sp.

Comme précédemment et pour les mêmes raisons, l'étude de pathogénicité de *Verticillium alfalfae* V31-2 chez *Nicotiana benthamiana* a été effectuée en utilisant les trois méthodes d'inoculation. L'échelle de symptômes utilisée est inspirée de celle utilisée pour *Arabidopsis thaliana* : c'est également une échelle de 0 à 5, mais en plus du niveau de chloroses, les flétrissements sont pris en compte lors du décompte de la proportion de feuilles infectées (**Figure C-45**). L'analyse de variance met en évidence un effet de la méthode d'inoculation sur le MSS obtenu (P -value : $5,27.e^{-6}$) : l'inoculation racinaire et l'inoculation par piqure sont les plus efficaces (avec respectivement des MSS de 4,625 et 3,75) suivi par l'inoculation par infiltration (MSS de 1,5) (**Figure C-46-A**).

Nicotiana benthamiana étant sensible à *Va* V31-2, d'autres espèces de *Nicotiana* ont été évaluées. Les accessions Amarello, Basma Xanti, Line 49-10, Oxford 1, Samsoun, TI 448-A, Vesta 30 et Virginia Gold proviennent de la collection de Nicotianées de l'Institut du Tabac de Bergerac (Seita - Groupe Impérial Tobacco). Ces accessions ont été choisies pour leurs niveaux de résistance à *Verticillium dahliae* décrits lors d'essais conduits dans des champs contaminés par plusieurs souches non identifiées de ce pathogène au milieu du XXème siècle : Amarello, Oxford 1, TI 448-A étaient résistantes, Vesta 30 et Virginia Gold étaient partiellement résistantes, Basma Xanti et Samsoun étaient sensibles. Ces niveaux de résistance ont été établis lors d'essais pluriannuels (4 ans) en fonction de la sévérité des symptômes de flétrissement : 4, flétrissement sévère, 1, peu de flétrissement et 0 aucun flétrissement lors du cycle de croissance complet des plantes (McLeod and Thomson, 1959; Wright, 1968). Les lignées 49-10 et 46-8 n'avaient pas encore été évaluées, mais compte tenu de la réponse différente des deux isolignées 49-10 et 46-8 inoculées par *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* race 0 et de la disponibilité de graines de la lignée 46-8, il nous a paru intéressant de tester la réponse à *Verticillium alfalfae* V31-2 chez ces deux lignées (Rancé *et al.*, 1998).

La **Figure C-46-B** est une représentation du MSS quatre semaines après inoculation. Comme lors des précédents tests, *Nicotiana benthamiana* est très sensible à l'inoculation. En revanche, les accessions de *Nicotiana tabacum* présentent peu de symptômes. Avec une P -value inférieure à $2.e^{-16}$, l'analyse de variance montre un effet accession dans la réponse à l'inoculation par *Va* V31-2. Les comparaisons multiples de moyennes permettent de mettre en évidence l'espèce sensible *Nicotiana benthamiana*, puis l'accession Basma Xanti qui présente un peu plus de symptômes que les autres accessions de *Nicotiana tabacum*. Les accessions les plus résistantes sont la lignée 46-8 et Samsoun.

Ces différents groupes obtenus après inoculation par *V. alfalfae* V31-2 ne correspondent pas à ceux qui avaient été obtenus après inoculation par *V. dahliae* tels que décrits par McLeod et Thomson (1959) et Wright (1968). Bien que l'échelle de symptôme que nous utilisons soit différente de celle

publiée précédemment (**Figure C-46-B**), notre échelle est également basée sur le flétrissement foliaire et après inoculation par V31-2, peu de flétrissement sont visibles.

De plus, même si notre test ne s'intéresse qu'aux stades précoces du développement de la plante (à la fin de l'expérience, les plantes sont âgées de huit semaines) et non pas à son cycle complet, l'inoculation artificielle en coupant et laissant tremper les plantes est plus standardisée qu'un essai réalisé dans un champ contaminé : si les accessions de *Nicotiana tabacum* étaient sensibles, elles devraient montrer des symptômes de flétrissement comme nous l'avons observé pour *Nicotiana benthamiana*. Ce résultat n'est pas inattendu compte tenu du fait qu'il s'agisse de deux espèces de pathogènes différents.

Compte-tenu du peu de symptômes observés, ce criblage a permis de mettre en évidence que *Verticillium alfalfae* V31-2 n'est pas un pathogène de *Nicotiana tabacum* et que le contrôle génétique de la résistance à *Verticillium alfalfae* et à *Verticillium dahliae* chez *Nicotiana tabacum* est différent. Chez *Verticillium alfalfae*, cette résistance s'apparente à une résistance non-hôte. C'est pourquoi, les pathosystèmes *Nicotiana tabacum* et *Nicotiana benthamiana* / *Verticillium alfalfae* n'ont pas été utilisés pour la validation fonctionnelle de nos gènes candidats à la résistance à *Verticillium alfalfae*.

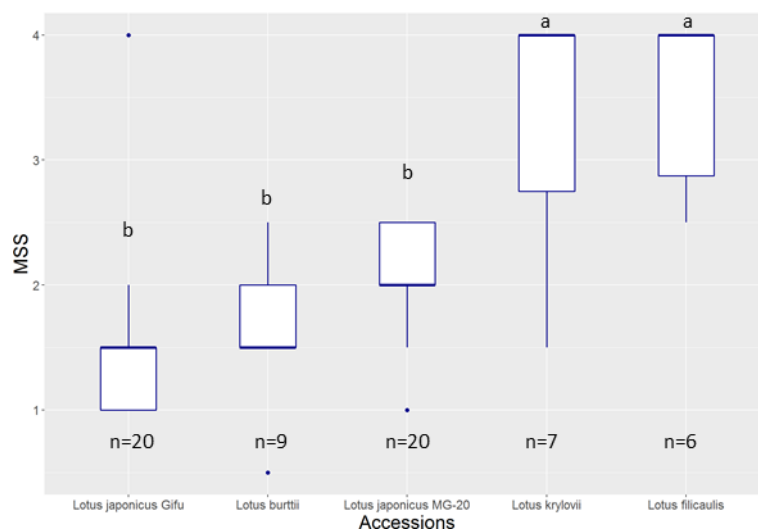


Figure C-47 : Evaluation de la pathogénicité de *Verticillium alfalfae* V31-2 chez *Lotus* sp. à 41 jours après inoculation racinaire.

Le MSS des plantes inoculées par *Va* V31-2 évaluées selon l'échelle de symptômes définies Figure B-7 page 152 est significativement différent en fonction des différentes accessions étudiées (P -value : $1,11.e^{-7}$). Les lettres correspondent aux groupes de moyennes obtenus avec le test de Student-Newman-Keuls en comparant le MSS aux différentes accessions. n : nombre de plantes inoculées. Une seule expérience a été effectuée.

c. *Lotus* sp.

Les tests de pathogénicité chez *Lotus* sp. ont été réalisés par inoculation racinaire en suivant le même protocole que pour *M. truncatula*. La réponse de quatre espèces différentes de *Lotus* sp. (*Lotus japonicus*, *Lotus burttii*, *Lotus krylovii* et *Lotus filicaulis*) à Va V31-2 a été évaluée. Pour l'espèce *Lotus japonicus*, les deux génotypes centraux expérimentaux Gifu et MG-20 ont été étudiés. Quinze jours après inoculation, des chloroses, des flétrissements et une défoliation commencent à être observés pour les accessions sensibles. La **Figure C-47** représente le MSS obtenu à 41 jours après inoculation par *Verticillium alfalfae* pour une répétition biologique. L'analyse de variance met en évidence une différence de réponse à Va V31-2 en fonction des différentes espèces et accessions ($P\text{-value} : 1,11.e^{-7}$). Ainsi les espèces *Lotus krylovii* et *Lotus filicaulis* sont sensibles à Va V31-2 (avec un MSS respectivement de 3,50 et 3,29) alors que les espèces *Lotus burttii* et *Lotus japonicus* (incluant les accessions MG-20 et Gifu) sont plutôt résistantes (MSS respectivement de 1,72, 2,08 et 1,48).

Ces résultats montrent que *Lotus* sp. est une plante hôte de *Verticillium alfalfae* et révèlent une diversité de réponse à ce pathogène parmi ces différentes espèces. Le lotier pourrait donc être utilisé comme modèle végétal hétérologue pour la validation fonctionnelle de gène de résistance à la verticilliose.

2. Recherche de gènes orthologues aux gènes candidats à la résistance à *Verticillium alfalfae* V31-2 chez *Lotus japonicus*

Parallèlement aux tests phytopathologiques étudiant la réponse à *Verticillium alfalfae* V31-2 chez les trois modèles végétaux *Lotus japonicus*, *Arabidopsis thaliana* et *Nicotiana* sp., des recherches d'orthologues aux gènes candidats à la résistance à *Va* V31-2 (Medtr7g070440 codant pour une protéine F-BOX et Medtr7g070480 codant pour une protéine SEC14) ont été effectuées par blastp (v2.2.24 (Altschul *et al.*, 1997)) chez ces trois espèces dans le but d'utiliser ces modèles végétaux pour des expériences de validation fonctionnelle en cas de tests de pathogénicité concluants.

Les analyses fonctionnelles en systèmes hétérologues n'ayant été développées dans le cadre de cette thèse que sur le lotier, seuls les résultats sur cette espèce seront présentés dans cette partie. Les résultats des recherches d'orthologues chez *Arabidopsis thaliana* et *Nicotiana* sp. sont disponibles en annexe page 431.

Chez *Lotus japonicus*, deux orthologues au gène Medtr7g070480 codant pour une protéine SEC14 ont été identifiés dans la version V3.0 du génome de l'accension de référence MG-20 (<https://lotus.au.dk/blast/>). Lj1g2391210 (chr1:28177135..28179722) code une patellin-6-like (autre nom des protéines SEC14 possédant les domaines GOLD, de liaison aux lipides CAL/TRIO et CRAL/TRIO N-terminale). D'une longueur de 472 acides aminés, cette protéine possède 89,83% d'homologie avec la protéine SEC14 de *Medicago truncatula*. Le second gène orthologue, identifié plus récemment (les premières recherches avaient été effectuées sur la version v2.5 du génome de *Lotus japonicus* MG-20) est Lj0g3v0140459 (chr0:64515100..64517913), gène codant également une patellin-6-like. Cette protéine présente un taux d'homologie avec la protéine SEC14 encodée par Medtr7g070480 de 89,13% pour une longueur totale de 427 acides aminés.

Le gène Medtr7g070440 codant pour une protéine F-BOX ne possède que de lointains orthologues chez *Lotus japonicus*. En effet, son plus proche orthologue est une protéine F-BOX, encodée par le gène Lj0g3v0353949 (chr0:186372746..186374532), d'une longueur de 384 acides aminés et ne possédant que 34,48% d'homologie avec la protéine F-BOX candidate à la résistance à la verticilliose chez *Medicago truncatula*.

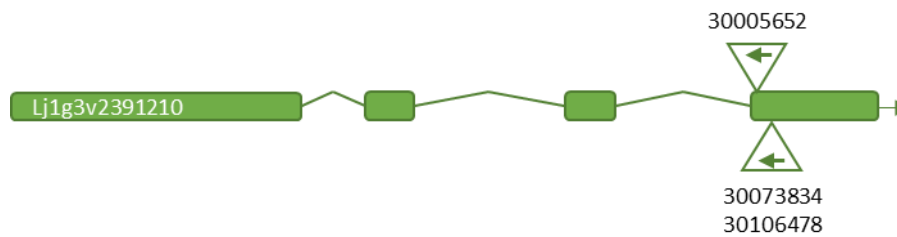


Figure C-48 : Positions du rétrotransposon *LORE1* au sein du gène *Lj1g3v2391210* pour les lignées mutantes 30005652, 30073834 et 30106478.

La séquence codante du gène *Lj1g2391210* (chr1:28177135..28179722) est représentée par les rectangles, les lignes correspondent aux introns. Les triangles se situent au niveau des sites d'insertion du rétrotransposon (respectivement à 2117 bp et 2137 bp du début du gène pour 30005652, 30073834 et 30106478), les flèches indiquent le sens de l'insertion.

3. Caractérisation génétique des mutants *LORE1* dans le gène Lj1g3v2391210 de *Lotus japonicus*, orthologue du gène candidat Medtr7g070480 codant pour une protéine SEC14

Le gène Lj1g2391210 étant le seul orthologue au gène Medtr7g070480 identifié au printemps 2015, des recherches de mutants *LORE1* dans ce gène ont été effectuées dans la base de données du CARB (<https://lotus.au.dk/lore1/search>). Trois lignées ont été identifiées (30005652, 30073834 et 30106478), commandées et mises en multiplication dans nos phytotrons. Les caractéristiques génétiques de ces lignées ainsi que l'emplacement des insertions au sein de la séquence codante sont présentées dans le **Tableau B-5** (page 142) et la **Figure C-48**.

Les résultats du génotypage des descendants en génération R4 des lignées 30005652, 30073834 et 30106478 obtenus au laboratoire sont présentés dans le **Tableau C-21**. Le génotypage de ces lignées nécessite deux réactions PCRs : une réaction PCR avec des amorces gènes spécifiques encadrant le site d'insertion du rétrotransposon *LORE1* et une réaction PCR avec l'amorce P2 s'hybridant sur le rétrotransposon et l'amorce sens gène spécifique (cf. **Tableau B-30** et **Figure B-16**, page 188). Chacune des PCR réalisées pour ce génotypage a été réalisée trois fois de façon indépendante afin de s'assurer qu'aucune erreur n'avait été commise. Des tests du χ^2 (avec permutations de Monte-Carlo compte-tenu de l'effectif faible des individus de chaque lignée) ont confirmé que la ségrégation des individus était conforme à la loi de Mendel (*P-value* : 0,2239 pour la lignée 30005652 ; 0,1179 pour la lignée 30073834 ; et 0,904 pour la lignée 30106478). Ce génotypage nous a également permis de mettre en évidence expérimentalement l'existence d'un gène homologue à Lj1g2391210 chez *Lotus japonicus* : un produit PCR secondaire apparaissait lors des réactions PCR utilisant les amorces gènes spécifiques (Annexe **Figure F-3**, page 433). Un nouveau blastp en utilisant la version v3.0 du génome de *Lotus japonicus* MG-20 a permis d'identifier l'autre gène orthologue à Medtr7g070480, homologue de Lj1g2391210 : Lj0g3v0140459.

L'évaluation de la réponse à *Verticillium alfalfae* V31-2 chez les mutants homozygotes et les homozygotes sauvages sera bientôt réalisée au sein de notre laboratoire. Néanmoins, la grande homologie de séquence entre les protéines codées par Lj1g2391210 et Lj0g3v0140459 (84,06% pour des protéines respectivement de longueurs 427 et 414 acides aminés) laisse craindre une possible redondance fonctionnelle. La lignée 30004502 disponible au CARB est une lignée possédant une insertion dans le gène Lj0g3v0140459. Il serait peut-être intéressant de commander cette lignée mutante et d'effectuer des croisements entre des mutants homozygotes dans les gènes Lj1g2391210 et Lj0g3v0140459 afin d'obtenir un double mutant et d'évaluer sa réponse à l'inoculation par *Va* V31-2.

Tableau C-21 : Génotypes des descendants des mutants *LORE1* dans le gène *Lj1g3v2391210* de *Lotus japonicus*, orthologue du gène *Medtr7g070480*.

Les individus correspondent aux descendants en génération R4 (4^{ème} génération de plantes autofécondées après régénération des plantes *in vitro* R0). L'amorce P2 s'hybride au niveau du rétrotransposon *LORE1*. Le protocole pour le génotypage par PCR de ces mutants est détaillé page 191.

Parents	Individus	Amorces sens et anti- sens gène spécifique	Amorces P2 + gène spécifique	Génotypes
30005652	A	O	O	Hémizygote
30005652	B	O	O	Hémizygote
30005652	C	O	O	Hémizygote
30005652	D	O	O	Hémizygote
30005652	E	N	O	Homozygote mutant
30005652	F	O	O	Hémizygote
30005652	G	O	O	Hémizygote
30005652	H	O	O	Hémizygote
30005652	I	O	O	Hémizygote
30073834	A	O	O	Hémizygote
30073834	B	O	N	Homozygote sauvage
30073834	C	O	O	Hémizygote
30073834	D	N	O	Homozygote mutant
30073834	E	O	O	Hémizygote
30073834	F	N	O	Homozygote mutant
30073834	G	O	O	Hémizygote
30073834	H	O	O	Hémizygote
30073834	I	N	O	Homozygote mutant
30073834	J	O	O	Hémizygote
30073834	K	O	O	Hémizygote
30073834	L	N	O	Homozygote mutant
30073834	M	N	O	Homozygote mutant
30073834	N	N	O	Homozygote mutant
30073834	O	N	O	Homozygote mutant
30073834	P	O	O	Hémizygote
30106478	A	N	O	Homozygote mutant
30106478	B	O	O	Hémizygote
30106478	C	O	N	Homozygote sauvage
30106478	D	N	O	Homozygote mutant
30106478	E	O	O	Hémizygote
30106478	F	O	O	Hémizygote
30106478	G	O	N	Homozygote sauvage
30106478	H	O	N	Homozygote sauvage
30106478	I	O	O	Hémizygote

N: Aucune amplification du produit PCR, O: Amplification du produit PCR.

C. RÉSULTATS

De plus, les résultats de validation fonctionnelle du gène Medtr7g070480 chez *Medicago truncatula* par l'analyse de la colonisation des hairy roots ont montré que ce gène était en fait un facteur de sensibilité. Si ce rôle est conservé chez *Lotus japonicus*, les mutants altérés dans les gènes orthologues à Medtr7g070480 pourraient être plus résistant que le sauvage. Or, Gifu est résistant à *Va* V31-2. La visualisation d'un différentiel de réponse entre mutants et wild type siblings risque d'être difficile.

V. Contribution à d'autres travaux de recherche sur l'étude de la résistance à la verticilliose chez *Medicago truncatula*

Au cours de mes travaux de thèse, j'ai eu l'opportunité de participer à d'autres travaux effectués au sein de notre laboratoire qui font l'objet de deux articles soumis pour lesquels je suis co-auteurice.

1. Temperature increase as predicted by climate change modifies susceptibility to *Verticillium* wilt in *Medicago truncatula* and may lead to the appearance of new and more aggressive strains of the pathogen (soumis, Sbeiti, Mazurier *et al.*)

a. Résumé des travaux

L'objectif principal de ces travaux a été d'étudier l'effet de la température sur la verticilliose chez *Medicago sp.* en évaluant les symptômes précoces de la maladie et la fitness des plantes après inoculation.

Ainsi, afin de sélectionner les souches nécessaires à cette étude, la croissance *in vitro* de douze souches de *Verticillium spp.* d'origine géographique différente et isolées de différentes espèces végétales ainsi que leur pathogénicité chez *Medicago truncatula* ont été évaluées à 20, 25 et 28°C. La plupart d'entre elles ont une croissance *in vitro* optimale à 25°C, et une pathogénicité accrue entre 20 et 25°C.

Etant donné l'absence de souche de *Verticillium spp.* pathogène à 28°C dans notre collection et afin de pouvoir mener cette étude à cette température, une mutagénèse de la souche *Va V31-2* de *Verticillium alfalfae* (pathogène à 25°C) a été réalisée afin d'adapter cette souche à 28°C. Pour cela, trois cycles d'exposition aux UV de spores de *Va V31-2* suivi par une inoculation de *Medicago truncatula* F83005.5 placé en phytotron à 28°C et un réisolement du champignon dans les parties aériennes de la plante ont été réalisés. Cent souches monospores ont ainsi été obtenues et leur pathogénicité a été évaluée à 28°C : toutes ces souches ont montré une agressivité accrue comparée à la souche sauvage *Va V31-2* à 28°C chez F83005.5, la souche AS38 a également montré des symptômes chez la lignée A17 (résistante à la souche sauvage).

L'évaluation des symptômes précoces de verticilliose chez sept lignées de *Medicago truncatula* et trois variétés de luzerne (*Medicago sativa*) après inoculation par AS38, *Verticillium alfalfae* V31-2 et *Verticillium non-alfalfae* VA1, 3 souches de *Verticillium sp.* aux optima de températures différents (AS38>V31-2>VA1) a été réalisée à 20, 25 et 28°C en comparant la sévérité de la maladie ainsi que la colonisation des parties aériennes par le champignon pathogène. Avec une augmentation de la température, des lignées résistantes (pas de symptômes et pas de champignon dans les tissus) deviennent

tolérantes (aucun symptôme mais colonisation des tissus par *Verticillium*) et d'autres accessions partiellement résistantes sont sensibles.

Les études menées en serre sur les sept lignées de *Medicago truncatula* ont montré une réduction de la fitness des plantes chez les lignées sensibles, avec un effet limité de la température initiale d'infection.

Cette étude a permis de mettre en évidence l'augmentation de la pathogénicité et une plus grande virulence du pathogène adaptée à une plus haute température.

b. Contribution personnelle à ces travaux

Ma principale contribution lors de ces travaux a été l'apport d'une aide technique lors des expériences demandant une main d'œuvre importante et un appui pour l'analyse statistique des données.

Ainsi, j'ai participé à l'inoculation des cent souches monospores mutées qui a été réalisée sur une semaine. La préparation de l'inoculum et la détermination de la concentration en spores de ces souches sont des tâches très chronophages.

Pour l'évaluation de la fitness en serre des lignées de *Medicago truncatula*, le nombre de gousses, le poids des gousses, et le poids des parties aériennes ont été évalués. Par souche et par répétition, cela représente 63 plantes. Cette étude ayant été réalisée sur deux souches avec deux répétitions, j'ai apporté une aide lors des récoltes.

La dernière contribution que j'ai apportée concerne l'aide pour l'analyse statistique des résultats acquis lors des différentes expériences (analyses de variance et représentations graphiques des résultats avec le logiciel R).

2. Genome admixture components accurately predict quantitative functional traits in plants (soumis, Gentzbittel, Ben, Mazurier *et al.*)

a. Résumé des travaux

L'objectif général de ces travaux menés chez la légumineuse modèle *Medicago truncatula* a été de mettre au point un modèle de prédiction de certains phénotypes quantitatifs dont la variation est la conséquence d'une multitude de mutations à petits effets.

La première étape de ces travaux a été de déterminer le nombre de génomes ancestraux constituant l'espèce *Medicago truncatula* en utilisant un sous-ensemble de 843 171 SNPs répartis de façon homogène sur les huit chromosomes de *Medicago truncatula*. Huit populations ont ainsi été détectées, et il a été constaté que le Maghreb était le centre de diversification de cette espèce, cinq des huit populations y sont présentes. L'association entre dix-neuf variables bio-climatiques définies par WorldClim et les génomes ancestraux a ensuite été testée : par exemple parmi les associations significatives, la population « South Tunisian Coastal » est corrélée positivement à la température annuelle moyenne et à la température moyenne du trimestre le plus froid et est corrélée négativement au cumul des précipitations annuelles.

Ensuite, en partant de l'hypothèse que la résistance quantitative à la verticilliose chez *Medicago truncatula* serait le fruit de multiples gènes à petits effets, des modèles linéaires utilisant la proportion de génomes ancestraux au sein des accessions ont été testés afin de prédire le phénotype MSS de réponse à l'inoculation par *Va* V31-2 chez *Medicago truncatula* (ces données de MSS sont celles obtenues dans le cadre de l'évaluation de la réponse à *Va* V31-2 de 246 accessions pour l'étude de génétique d'association présentée dans cette thèse). Le meilleur modèle de prédiction obtenu est basé sur quatre génomes ancestraux. La validation de ce modèle de prédiction a ensuite été réalisée expérimentalement en inoculant par *Verticillium alfalfae* V31-2 32 accessions de *Medicago truncatula* originaires de l'Est du bassin méditerranéen (prédites sensibles) et 39 accessions originaires de l'Ouest du bassin méditerranéen (prédites résistantes). 81,3% des accessions prédites résistantes se sont montrées résistantes et 69,3% des accessions prédites sensibles étaient sensibles. Ces résultats ont permis de valider ce modèle de prédiction. De plus, d'autres phénotypes quantitatifs déjà publiés par d'autres chercheurs tels que la taille des plantes, le nombre de feuilles, le nombre de nodules (Stanton-Geddes *et al.*, 2013) et la résistance à un autre pathogène racinaire *Aphanomyces euteiches* (Bonhomme *et al.*, 2013) ont également été prédits par cette même méthode.

Pour finir, en fonction des phénotypes quantitatifs, les modèles de prédiction obtenus par la méthode que nous avons développée basée sur les composantes d'admixture génomique sont au moins aussi ou plus performants que les modèles couramment utilisés en sélection génomique tels que G-BLUP ou LASSO.

Cette étude permet une meilleure compréhension des relations entre variation génomique et variation phénotypique pour des traits quantitatifs tels que la résistance à la verticilliose afin d'améliorer la prédiction de l'évolution des génomes mais aussi pour la sélection variétale.

b. Contribution personnelle à ces travaux

Lors de ce projet, l'analyse de la prédiction de la réponse à *Verticillium* chez *Medicago truncatula* a reposé sur les données phénotypiques obtenues sur les 246 accessions de la collection MtHapmap, données que j'ai largement contribué à obtenir au niveau expérimental (cf. **Tableau F-2**, page 407).

J'ai également mené les analyses statistiques ayant permis d'obtenir les moyennes ajustées de MSS sur lesquelles sont basées les calculs.

Enfin, j'ai été impliquée lors de l'étape de validation fonctionnelle du modèle de prédiction du phénotype de réponse à l'inoculation par *Verticillium alfalfae* V31-2 chez *Medicago truncatula* : j'ai effectué les deux répétitions biologiques des expériences d'inoculation sur les 32 accessions originaires de l'Est du bassin méditerranéen (prédites sensibles) et les 39 accessions originaires de l'Ouest du bassin méditerranéen (prédites résistantes).

D. DISCUSSION GÉNÉRALE

I. Biodiversité de la réponse de *Medicago truncatula* à *Verticillium alfalfae*

L'inoculation par *Verticillium alfalfae* V31-2 d'un ensemble de 261 accessions naturelles de *Medicago truncatula* et de 90 accessions appartenant à la population tunisienne Soliman a permis de mettre en évidence une biodiversité de la réponse des différents génotypes de plantes au pathogène. Le suivi pendant quatre semaines des symptômes a permis d'obtenir cinq phénotypes : l'AUDPC (aire sous la courbe de progression de la maladie, phénotype de cinétique de l'évolution des symptômes de maladie), le MSS (score maximum de maladie), et les paramètres de modélisation Asym, xmid et scal. Le taux de réisolement (colonisation des parties aériennes de *Medicago truncatula* par *Verticillium alfalfae* V31-2) a également été évalué. L'analyse de ces phénotypes a permis de mettre en évidence des accessions résistantes, partiellement résistantes, sensibles et tolérantes. Les données récoltées sur les 261 accessions naturelles ont également fait l'objet d'une modélisation afin de caractériser le plus finement l'évolution des symptômes de ces accessions en utilisant les paramètres Asym et xmid. Les analyses de génétique d'association conduites sur la biodiversité naturelle de *Medicago truncatula* et sur la population Soliman ont permis d'identifier différents QTLs de résistance selon les phénotypes analysés. En effet, sur la biodiversité naturelle de *Medicago truncatula* l'analyse de GWAS réalisée sur les phénotypes et paramètres de progression de maladie AUDPC, MSS et Asym a mis en évidence deux QTLs majeurs de résistance à *Verticillium alfalfae* V31-2 sur les chromosomes 1 et 7. A partir du paramètre de progression de la maladie xmid, un second QTL de résistance a été identifié sur le chromosome 7. Le phénotype de colonisation des parties aériennes par le pathogène a permis la mise en évidence de trois nouveaux QTLs sur les chromosomes 1, 3 et 7 ne colocalisant pas avec les QTLs obtenus pour les autres phénotypes. Les SNPs les plus significatifs obtenus par l'analyse de GWAS réalisée sur la population Soliman de *Medicago truncatula* sont différents de ceux obtenus avec les études de génétiques d'association sur les phénotypes et paramètres de progression de la maladie et de colonisation par le pathogène. L'ensemble de ces résultats montrent la diversité des mécanismes génétiques de résistance de *Medicago truncatula* à *Verticillium alfalfae*.

1. Identification de différentes sources de résistance à *Verticillium alfalfae* chez *Medicago truncatula* en fonction des phénotypes et paramètres de maladie

L'analyse QTL de résistance à *Va* V31-2 réalisée sur les populations de RILs LR3, LR4 et LR5 avait déjà permis de mettre en évidence des sources de résistance distinctes chez les génotypes A17 et DZA45.5 (Ben *et al.*, 2013a). Un QTL majeur provenant du fond génétique A17 sur le chromosome 7, obtenu pour les phénotypes de pourcentage de plantes mortes, d'AUDPC et de MSS ainsi que deux QTLs mineurs sur les chromosomes 2 et 6 provenant du fond génétique DZA45.5 pour le phénotype pourcentage de plantes mortes ont été identifiés (Ben *et al.*, 2013a).

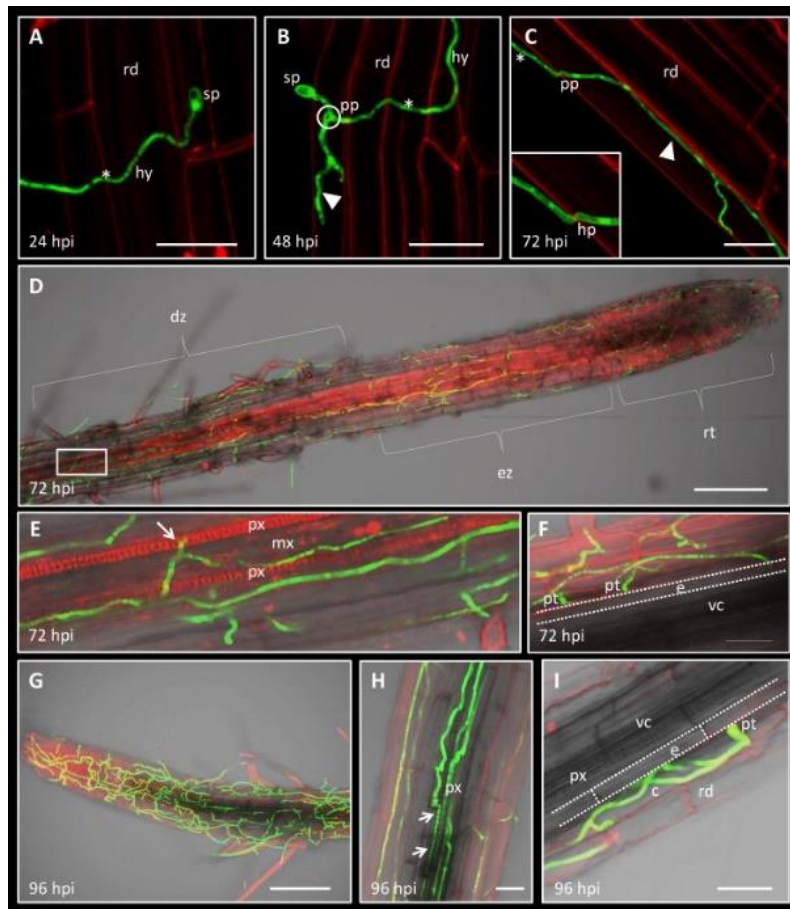


Figure D-1 : Phases intermédiaires de colonisation par *Verticillium longisporum* VL43 exprimant une GFP des racines de l'accession sensible Col-0 d'*Arabidopsis thaliana* (extrait de Reusche *et al.*, 2014).

A. Spores germées et croissance des hyphes à la surface des racines 24 heures après inoculation.

B et C. Pénétration de VL43 dans le rhizoderme et croissance intracellulaire à 48 et 72 heures après inoculation. L'agrandissement en C met en évidence la pénétration de la paroi cellulaire par la formation de l'hyphopode.

D et E. Colonisation de l'extrémité de la racine, et des zones d'élongation et de différenciation de la racine à 72 heures après inoculation. L'agrandissement en E montre la croissance intracellulaire du pathogène dans le méta et protoxylème.

F. Non pénétration du pathogène dans les éléments conducteurs grâce à l'endoderme à 72 heures après inoculation.

G, H et I. Racines colonisées, croissance intracellulaire du pathogène dans le protoxylème et non pénétration du pathogène grâce à l'endoderme à 96 heures après inoculation.

c : cortex, e : endoderme, hy : hyphes, hp : hyphopode, mx : métaxylème, pp : point de pénétration, pt : essai de pénétration, px : protoxylème, rd : rhizoderme, sp : spore et vc : cylindre central. Les étoiles indiquent la croissance des hyphes le long de la surface racinaire, les têtes de flèches montrent la croissance intracellulaire du champignon et les flèches mettent en évidence la croissance du pathogène dans le protoxylème. Les lignes pointillées représentent les bordures des cellules de l'endoderme. Bars : 25 μ m pour A, B, C, F, H et I, 125 μ m pour D et G.

Les QTLs identifiés sur le chromosome 7 par les analyses de génétique d'association en utilisant les phénotypes de progression de la maladie AUDPC et MSS ainsi que le paramètre de modélisation Asym colocalisent avec ceux qui ont déjà été publiés (**Figure C-11**, page 218). Ces analyses ont aussi permis d'identifier un autre QTL majeur sur le chromosome 1 (**Figure C-13**, page 220). Pour le phénotype xmid, un second QTL présent sur le chromosome 7 ne colocalisant pas avec celui identifié pour les phénotypes AUDPC, MSS et Asym a été mis en évidence. Ce dernier colocalise néanmoins avec le QTL de résistance à *Verticillium alfalfae* V31-2 déterminé chez la population LR5 (**Figure C-15**, page 222).

Les QTLs obtenus pour le phénotype de colonisation de la plante par le champignon sur les chromosomes 1, 3 et 7 ne colocalisent pas avec ceux obtenus pour les phénotypes de progression de la maladie. Différents contrôles génétiques sont donc responsables de la progression de la maladie et de la colonisation des parties aériennes de *Medicago truncatula* par *Verticillium alfalfae*. L'existence d'un mécanisme de résistance éradiquant la présence du pathogène dans la racine de *Medicago truncatula* est un mécanisme singulier de résistance à *Verticillium*. En effet, l'évolution de la colonisation racinaire de *Medicago truncatula* A17 et F83005.5 par une souche Va V31-2 exprimant la GFP et ayant une pathogénicité similaire à celle de V31-2 (souche A1b2) a été observée par microscopie confocale à balayage laser (Toueni *et al.*, 2016). Durant les premières phases de colonisation, il n'y a aucune différence entre les deux génotypes : les conidies sont happées dans les vaisseaux du xylème au niveau des blessures des racines par le flux de transpiration 2 heures après inoculation et germent 24 heures après inoculation, puis les hyphes colonisent les vaisseaux. Entre 4 et 7 jours après inoculation, les racines de l'accession résistante A17 ne présentent plus aucune trace de *Verticillium alfalfae* V31-2 alors que les hyphes ont complètement colonisé le cylindre central de l'accession sensible F83005.5. Après 12 jours, les hyphes se développent également dans le cortex racinaire (**Figure A-32**). L'élimination du pathogène a donc lieu au sein de la racine chez *Medicago truncatula* contrairement à *Verticillium dahliae* ou *Verticillium longisporum* où la résistance a lieu au niveau des parties aériennes chez le coton (*Gossypium hirsutum*), le colza (*Brassica napus*) ou encore *Arabidopsis thaliana* (Eynck *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2013b; Reusche *et al.*, 2014). L'évolution de la colonisation racinaire de l'accession sensible d'*Arabidopsis thaliana* Col-0 par les souches de Vd JR2 et VI VL43 exprimant la GFP a été observée par microscopie confocale à balayage laser (Reusche *et al.*, 2014). Les stades précoces et intermédiaires de l'infection de Col-0 par ces deux souches sont identiques. 24 heures après inoculation, les spores des deux souches de *Verticillium* germent, et les hyphes croissent le long de la surface racinaire. Entre 24 et 48 heures après inoculation, le champignon pénètre dans le rhizoderme grâce à la formation d'hyphopode et poursuit sa croissance intracellulaire. À 72 heures après inoculation, les deux espèces colonisent massivement les racines d'*Arabidopsis thaliana* de l'extrémité de la racine à la zone d'élongation, puis à la zone de différenciation avant de pénétrer dans

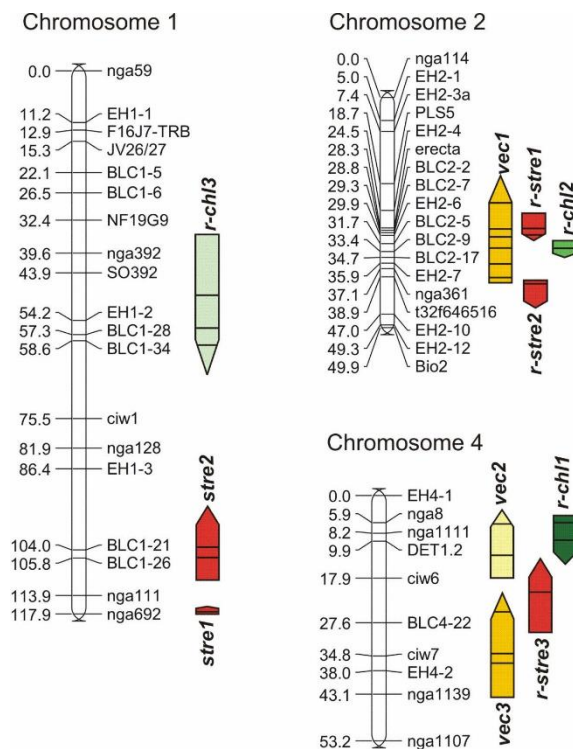


Figure D-2 : Localisation de QTLs contrôlant la résistance à *Verticillium longisporum* chez *Arabidopsis thaliana* pour différents traits phénotypiques (extrait de Häffner *et al.*, 2014).

Les chromosomes sont représentés par des barres blanches, la position des marqueurs est indiquée en cM. Les différents QTLs sont colorés en fonction des phénotypes analysés : en jaune clair, pourcentage de parties aériennes colonisées pour l'expérience 1, en jaune foncé pourcentage de parties aériennes colonisées pour l'expérience 2, en rouge, retard de croissance, en vert foncé nombre de feuilles chlorosées pour l'expérience 1, en vert intermédiaire, pourcentage de feuilles chlorosées pour l'expérience 1, en vert clair différence du nombre de feuilles chlorosées entre les témoins inoculés avec de l'eau et les plantes inoculées par *Vl* pour l'expérience 1. Le sens d'orientation des flèches indique le parent dont est issu l'allèle conférant la résistance : vers le haut pour le parent Ler, vers le bas pour Bur. Le pourcentage de parties aériennes colonisées a été déterminé à partir de l'apex de la plus haute hampe florale à maturité des siliques, l'évaluation du nombre de feuilles chlorosées a été effectuée 17 jours après inoculation.

str : retard de croissance, vec : colonisation des parties aériennes par *Verticillium*, chl : chloroses. Les noms précédés par *r* correspondent aux nouveaux QTLs décrits à partir de la population de RILs en F6.

le cylindre central et de coloniser le méta et le protoxylème. A 96 heures après inoculation, la surface racinaire et le cylindre central sont massivement colonisés. Les deux souches des espèces *Verticillium longisporum* et *Verticillium dahliae* ne peuvent pénétrer dans le cylindre central lorsque l'endoderme est développé.

Ce processus de colonisation est illustré sur la **Figure D-1** pour *Verticillium longisporum* VL43 chez *Arabidopsis thaliana* Col-0. Chez les accessions résistantes, cette colonisation racinaire est également observée mais à de plus faibles niveaux (Reusche *et al.*, 2014).

Des différences de mécanismes génétiques entre colonisation par un pathogène et développement des symptômes de maladie ont déjà été observées chez d'autres pathosystèmes tels que *Arabidopsis thaliana* et *Verticillium longisporum* (Häffner *et al.*, 2010, 2014) ou encore *Pisum sativum* et *Aphanomyces euteiches* (Lavaud *et al.*, 2016). Concernant le pathosystème *Verticillium longisporum* - *Arabidopsis thaliana*, une première étude QTL a été réalisée sur une population de RILs en F2 et issue du croisement entre les accessions Bur et Ler. *Verticillium longisporum* provoque un retard de croissance chez cette population d'*Arabidopsis thaliana* contrôlé par deux QTLs sur le chromosome 1 et trois QTLs sur le chromosome 5, la colonisation systémique par *Verticillium* est contrôlée par un QTL sur le chromosome 2, deux sur le chromosome 4 et un sur le chromosome 5 (Häffner *et al.*, 2010). Cette étude a été de nouveau réalisée en deux expériences indépendantes en utilisant la population de 188 RILs en F6. Cette dernière a permis de confirmer l'existence de certains QTLs et d'en découvrir de nouveaux. La **Figure D-2** permet de visualiser la position des différents QTLs sur les chromosomes 1, 2 et 4 d'*Arabidopsis thaliana* : les QTLs *r-stre1* (chromosome 2), *r-stre2* (chromosome 2), et *r-stre3* (chromosome 4) contrôlent le retard de croissance, les QTLs *r-chl1* (chromosome 1), *r-chl2* (chromosome 2), *r-chl3* (chromosome 3) sont impliqués dans l'apparition des chloroses et les QTLs *vec1* (chromosome 2), *vec2* (chromosome 4) et *vec3* (chromosome 4) sont responsables de la colonisation par *Verticillium longisporum*. Ces différents QTLs ne colocalisent pas tous entre eux et soulignent les différents mécanismes génétiques impliqués dans la résistance à *Verticillium longisporum* chez *Arabidopsis thaliana*. Aucune validation fonctionnelle n'a été réalisée afin d'identifier les gènes impliqués dans la colonisation du pathogène. Néanmoins, certaines voies hormonales et métaboliques ont été décrites pour leur implication dans la colonisation. Ainsi, l'étude de NILs au niveau du QTL *vec1* a permis de mettre en évidence pour les individus sensibles possédant les allèles du parent Ler une forte induction de l'acide absicique (ABA) par rapport aux plantes non inoculées et un maintien de la quantité d'acide jasmonique (JA) à maturité. Au contraire, les individus résistants possédant les allèles du parent Bur montrent une légère augmentation de la quantité d'ABA et une diminution de la quantité de JA (Häffner *et al.*, 2014). Pour finir, l'analyse de mutants d'*Arabidopsis thaliana* dans la voie des phénylpropanoïdes a contribué à la mise en évidence de leur

rôle dans la résistance à *Verticillium longisporum* : les plantes ne synthétisant pas le sinapoyl glucose sont moins résistantes que celles qui le synthétisent, celles qui produisent en excès la coniférine sont plus résistantes, et ces métabolites ont également la particularité de réduire la croissance *in vitro* de *Verticillium longisporum* (König *et al.*, 2014).

Chez le pois, deux QTLs majeurs sur les chromosomes 4 et 7 contrôlent la décoloration de la racine causée par *Aphanomyces euteiches* et trois QTLs mineurs sur les chromosomes 2, 3 et 5 contrôlent la colonisation (Lavaud *et al.*, 2016).

2. Une évaluation de la réponse à *Verticillium* à des stades de développement de *Medicago truncatula* plus tardifs pourraient révéler de nouvelles sources de résistance

L'évaluation des phénotypes de maladie a eu exclusivement lieu en phytotron et sur des stades précoces de développement de *Medicago truncatula* (avant floraison). Toutefois, l'évaluation de la QDR chez des plantes adultes pourrait également être intéressante puisque l'expression de certains gènes de résistance peut être dépendante du stade de développement de la plante comme par exemple les QTLs de résistance partielle à la rouille chez l'orge (*Hordeum vulgare*) causée par *Puccinia hordei*. En effet, une étude des QTLs *RPHQ2*, *RPHQ3* et *RPHQ4* a été réalisée chez des NILs, ainsi que chez les lignées L94 (sensible) et Vada (partiellement résistante). Les différentes lignées ont été inoculées à différents stades de développement phénotypique de l'orge en serre et leur résistance a été estimée par le temps de latence (pour chaque feuille, intervalle de temps entre l'inoculation et l'apparition de 50% du nombre final de pustules). Elle a permis de mettre en évidence que *RPHQ2* était efficace du stade 1 à 3 feuilles, *RPHQ4* après le stade 3 feuilles et *RPHQ3* n'est pas dépendant du stade de développement de la feuille (Wang *et al.*, 2010).

Chez *Medicago truncatula*, l'évaluation de la résistance à *Verticillium alfalfae* V31-2 a été réalisée à des stades précoces (apparition de la deuxième feuille trifoliée et avant floraison) à trois températures (20, 25 et 28°C) en phytotron et en utilisant l'échelle de notation des symptômes de 0 à 4 (Ben *et al.*, 2013a) pour sept différents génotypes (Sbeiti *et al.*, soumis). Après quatre semaines, les plantes inoculées à ces trois températures ont été transférées en serre et la résistance à V31-2 a été estimée par la fitness des plantes en fin de cycle (nombre de gousses). Les expériences réalisées en phytotron ont montré une interaction significative entre les lignées et les températures d'inoculation, en d'autres termes la sévérité des symptômes de la maladie chez les différentes accessions dépend de la température à laquelle a lieu l'évaluation des phénotypes. Au stade tardif, l'évaluation de la fitness n'a

montré aucune interaction significative entre les différentes lignées inoculées et la température d'inoculation initiale. De plus, l'évaluation précoce des symptômes reflète les résultats de fitness à la fin du cycle biologique de *Medicago truncatula* pour six des sept génotypes testés (F83005.5, DZA315.16 et SA3780 sensibles, A17 et PRT180-A résistantes et DZA45.5 partiellement résistante). Néanmoins, l'accession SA9048 décrite partiellement résistante lors de l'évaluation des phénotypes de maladies précoces présente une forte réduction de son nombre de gousses en condition inoculée par rapport aux plantes contrôles. Deux hypothèses peuvent expliquer ce résultat : soit la progression de la maladie au sein de cette lignée est lente, soit il existe un coût important de la résistance au détriment de la fitness (Sbeiti *et al.*, soumis). L'évaluation de phénotypes plus tardifs sur un plus grand nombre d'accessions de *Medicago truncatula* pourrait donc permettre d'identifier d'autres sources de résistance à *Verticillium alfalfae* chez *Medicago truncatula*.

3. Comparaison des résultats de génétique d'association obtenus au sein de la biodiversité de *Medicago truncatula* et de la population tunisienne Soliman

Les analyses de GWAS réalisées sur la collection *MtHapmap* traduisant la biodiversité de l'espèce *Medicago truncatula* et sur la population Soliman n'ont pas montré de gènes candidats à la résistance à *Verticillium alfalfae* communs. Ces résultats ne sont pas inattendus compte tenu des caractéristiques de la population Soliman ainsi que de la méthode d'étude. En effet, l'étude sur la biodiversité au sein de la collection *MtHapmap* met en évidence les allèles à des gènes candidats à la résistance à la verticilliose les plus abondants au sein de l'espèce, ces allèles ne sont pas obligatoirement ceux qui sont présents dans la population Soliman. De plus, bien qu'il existe une biodiversité de la réponse à *Verticillium* chez la population Soliman, il n'y a que quatre accessions partiellement résistantes au pathogène (soit 4,5%), et le GWAS ne permet pas de mettre en évidence l'association entre les allèles rares et le phénotype étudié (la MAF (Minor Allele Frequency) est de 5%, la diminution de ce taux augmente le risque de faux positifs). Comme évoqué précédemment, cette population a initialement été sélectionnée pour ses différents niveaux de tolérance à la salinité et non pour sa résistance à *Verticillium*, ceci pourrait expliquer le nombre très réduit d'individus résistants au pathogène que nous possédons dans cette étude. Néanmoins, des études de génétique d'association intra-populations ont été conduites avec succès lorsqu'il existait une biodiversité naturelle de la réponse des accessions pour les phénotypes mesurés. Par exemple, chez *Arabidopsis thaliana* un modèle linéaire général (GLM) a été utilisé sur une population de 48 individus afin de tester l'adaptation locale à la compétitivité. Pour mesurer la compétitivité intraspécifique et interspécifique, des cultures des différentes accessions d'*Arabidopsis thaliana* ont été réalisées en condition sans compétition, en compétition avec d'autres accessions d'*Arabidopsis thaliana* ou en compétition avec quatre autres espèces communément

présentes en milieu naturel (*Poa annua*, *Stellaria media*, *Trifolium repens* et *Veronica arvensis*). Neuf traits phénotypiques différents tels que la biomasse aérienne sèche ont été mesurés, puis en utilisant un GLM avec un MAF à 20%, des gènes candidats ont été identifiés avec succès (Baron *et al.*, 2015). Une nouvelle analyse avec un tel MAF est envisageable afin de tirer le plus d'informations possible de ce jeu de données.

Les gènes candidats à la résistance à *Verticillium* identifiés chez la population Soliman ne correspondent pas non plus aux gènes surexprimés ou sous-exprimés mis en évidence lors de l'étude transcriptomique réalisée sur les génotypes A17 et F83005.5 en condition contrôle et inoculée. Ils n'appartiennent pas non plus au module de régulation précédemment décrit (**Figure A-33**, page 104) et impliqué dans la réponse à l'inoculation par *Va* V31-2 du génotype A17 (Toueni *et al.*, 2016).

4. Complémentarité des approches QTL, GWAS, transcriptome et sélection génomique

Différentes approches complémentaires ont été utilisées au sein de notre laboratoire pour étudier le pathosystème *Medicago truncatula/Verticillium alfalfae* V31-2. Les premiers QTLs de résistance ont été identifiés à partir de populations de RILs ; des sources de résistances provenant des accessions A17 et DZA45.5 ont été découvertes (**Figure A-31**, page 100). Chez la population LR3 (DZA45.5 [résistante] x F83005.5 [sensible]), deux QTLs de résistance mineurs sur les chromosomes 2 (4 cM) et 6 (21 cM) ont été mis en évidence, ils expliquent ensemble 22% de la variance phénotypique observée chez la population LR3. Chez les populations LR4 (A17 [résistante] x DZA315.16 [sensible]) et LR5 (A17 [résistante] x F83005.5 [sensible]), un QTL de résistance majeur a été identifié sur le chromosome 7 (QTL de taille 15 cM pour LR4 et 12 cM pour LR5), ce QTL colocalise en partie chez ces deux populations. Chez LR4, ce QTL explique jusqu'à 32,9% de la variance phénotypique observée, chez LR5, il en explique jusqu'à 42% (Ben *et al.*, 2013a). Les trois principales limites de l'utilisation de cette méthode résident dans le manque de diversité génétique de la population biparentale, dans la résolution de la carte génétique qui est contrainte par le taux de recombinaison de la population et dans l'impossibilité de distinguer l'épistasie de gènes physiquement proches (Bergelson and Roux, 2010; Korte and Farlow, 2013).

Les résultats de détection de QTL réalisée sur les populations de RILs confortent les résultats de l'étude de génétique d'association obtenue avec les phénotypes de développement de maladie MSS et AUDPC du chromosome 7. Ce dernier colocalise avec les QTLs obtenus avec les populations LR4 et LR5 mais en réduisant considérablement leurs tailles : le QTL GWAS couvre une région génomique de 30 kb incluant 5 gènes prédits (**Figure C-11**, page 218) alors que les QTLs de la population LR4 mesurent plus de 4 380 kb et celui de LR5 plus de 5 810 kb (incluant respectivement 580 et 710 gènes prédits). Cette analyse a également permis la découverte de QTLs de résistance à la verticilliose non identifiés en travaillant sur les populations de RILs : en utilisant des accessions naturelles, la diversité allélique au sein de la population permet d'identifier de nouvelles sources de résistance telle que le QTL majeur du chromosome 1 colocalisant avec le gène candidat Medtr1g042160 codant pour une protéine MATH. La principale limite aux études de génétiques d'association est qu'elles détectent facilement un petit nombre de loci à fortes contributions (architecture génétique du trait simple) alors qu'elles sont beaucoup moins performantes pour détecter les loci contrôlant les traits à architecture génétique complexe (un grand nombre de variants communs à contributions faibles ou peu de variants rares à contributions importantes) (Korte and Farlow, 2013).

L'étude transcriptomique par MACE réalisée sur l'accèsion résistante A17 et l'accèsion sensible F83005.5 en condition contrôle et inoculée à 0, 4, 8 et 24 heures après inoculation a permis la découverte d'un réseau de co-expression de gènes chez A17 (Toueni *et al.*, 2016). Ce réseau à cinq modules principaux permet d'obtenir une vision globale de la réponse à l'infection par *Verticillium alfalfae* V31-2 chez la lignée résistante. L'un de ces modules (le module Greenyellow) contient la majorité des gènes différenciellement exprimés, dont des gènes associés à la perception des PAMPs et des voies hormonales ainsi que des facteurs de transcription, suggérant ainsi que la résistance à *Va* V31-2 chez A17 serait une PTI avec implication hypothétique de l'acide abscissique (**Figure A-33**, page 104). Dans le cadre de l'étude de génétique d'association et de l'identification des différents gènes candidats à la résistance à *Va* V31-2 chez *Medicago truncatula*, cette étude transcriptomique a permis de réduire le nombre de gènes candidats en ne conservant que les gènes exprimés dans les racines avant inoculation et en conditions contrôles et inocuées à 4, 8 et 24 heures après inoculation. Ainsi, le nombre de candidats du chromosome 7 est passé de cinq (Medtr7g070425, Medtr7g070440, Medtr7g070450, Medtr7g070470 et Medtr7g070480) aux deux gènes Medtr7g070440 (codant pour une protéine F-BOX) et Medtr7g070480 (codant pour une protéine SEC14). Sous le pic du chromosome 1, parmi neuf gènes, le seul gène candidat exprimé dans les racines de *Medicago truncatula* inocuées par *Va* V31-2 à 4, 8 et 24 heures après inoculation ou en condition contrôle est le gène Medtr1g042160 (codant pour une protéine à domaine MATH). Néanmoins, ces trois gènes candidats principaux Medtr1g042160, Medtr7g070440 et Medtr7g070480 ne font pas partie des gènes surexprimés après inoculation chez A17 et F83005.5 et ils n'appartiennent pas non plus au module de co-expression Greenyellow, le GWAS permet donc d'identifier d'autres mécanismes génétiques de résistance à *Verticillium alfalfae* V31-2 chez *Medicago truncatula* non mis en évidence par l'étude transcriptomique de la réponse au pathogène à des temps précoces après infection.

Au-delà de notre modèle d'étude, il existe d'autres exemples où la complémentarité du GWAS, des QTLs identifiés sur des populations biparentales et des données d'expression de gène ont permis de disséquer les mécanismes génétiques impliqués dans différents traits phénotypiques. Chez le maïs (*Zea mays*) par exemple, l'architecture génétique de la biosynthèse des réserves lipidiques des grains a été déterminée en combinant GWAS, QTLs et eQTLs. En effet, à partir de 368 lignées de maïs et d'un jeu de 1,03 millions de SNPs situés uniquement au sein de gènes annotés, 74 loci significativement associés à la concentration et à la composition de l'huile de maïs ont été identifiés. Vingt-et-un loci sont connus pour leur implication dans le métabolisme lipidique chez *Arabidopsis thaliana* ou d'autres espèces. Les protéines encodées par le reste des gènes correspondent à des facteurs de transcription, des enzymes impliquées dans les voies de réactions d'oxydo-réduction ou du métabolisme protéique, des complexes de transports et le dernier tiers de ces protéines n'ont pas encore de fonction identifiée.

Parmi ces 74 loci, 43 colocalisent avec des QTLs précédemment publiés ou identifiés à partir des trois populations biparentales utilisées dans cette étude. C'est le cas par exemple de deux des gènes les plus significativement associés à la concentration en acide gras, le gène *FAD2* (chromosome 4) encodant une oléate désaturase ou encore le gène *DGAT1-2* (chromosome 9) codant une diacylglycérole transférase. Afin d'identifier de possibles régulations transcriptionnelles des gènes impliqués dans la biosynthèse des lipides dans le grain de maïs, la corrélation entre les SNPs et les niveaux d'expression de 67 des 74 gènes identifiés (les données d'expression des 7 autres gènes n'étaient pas disponibles) a été calculée. 41 des 67 loci correspondent à des eQTLs et montrent une corrélation significative entre les polymorphismes de séquences d'ADN et les niveaux d'expression des gènes. De plus, 14 de ces 41 gènes sont directement liés à la variation phénotypique observée, suggérant ainsi l'existence d'une régulation transcriptionnelle des traits étudiés. Pour conclure cette étude, un réseau de corégulation des gènes a été construit afin d'identifier les relations présentes entre ces 67 gènes. Ce réseau a notamment mis en évidence le rôle du gène *GRMZM2G132468* encodant une protéine putative de liaison aux lipides Ca^{2+} dépendante, nœud central du réseau de régulation de la biosynthèse des lipides dans le grain de maïs se trouvant en amont d'autres gènes candidats clés identifiés par génétique d'association tels que *FAD2* et *DGAT1-2* (Li *et al.*, 2012a).

Un autre exemple chez le maïs pour illustrer la complémentarité des différentes études génomiques concerne la recherche de gène de résistance à la cercosporiose (ou maladie des tâches grises) causée par *Cercospora zea-maydis* et *Cercospora zeina*. En effet quatre QTLs ont été identifiés à partir d'une population biparentale sur les chromosomes 1, 6, 7 et 8. Ces QTLs expliquent 43,13% de la variance phénotypique observée, mais compte tenu de la faible résolution de la population biparentale, les intervalles des QTLs recouvrent de larges portions de chromosome de tailles respectives de 52, 83, 113 et 104 Mb. Dans cette étude, le GWAS a été utilisé pour réduire la taille des QTLs afin de développer des marqueurs pour effectuer de la sélection variétale assistée par marqueurs (MAS). Pour cela, 300 lignées de maïs ont été sélectionnées à partir de leur niveau de résistance connu à la maladie des tâches grises, ce panel regroupe des lignées sensibles, modérément sensibles, modérément résistantes et résistantes. Grâce à la biodiversité du panel de lignées utilisé pour l'étude de génétique d'association, 13 QTLs ont été identifiés sur les chromosomes 1, 6, 7 et 8, mais seuls les QTLs colocalisant avec les QTLs identifiés grâce à la population biparentale ont fait l'objet d'une étude approfondie. L'un des résultats de l'étude de génétique d'association a permis de déterminer que le QTL à large effet identifié sur le chromosome 8 grâce à la population biparentale (il explique à lui seul 26,5% de la variance phénotypique observée et possède une taille de 104 Mb), se décomposerait en fait en deux QTLs à effets plus faibles, de tailles de 6 et 19 Mb. La taille des autres QTLs sur les chromosomes 1, 6 et 7 a respectivement été réduite à 3,58, 3,66 et 10,3 Mb (Mammadov *et al.*, 2015).

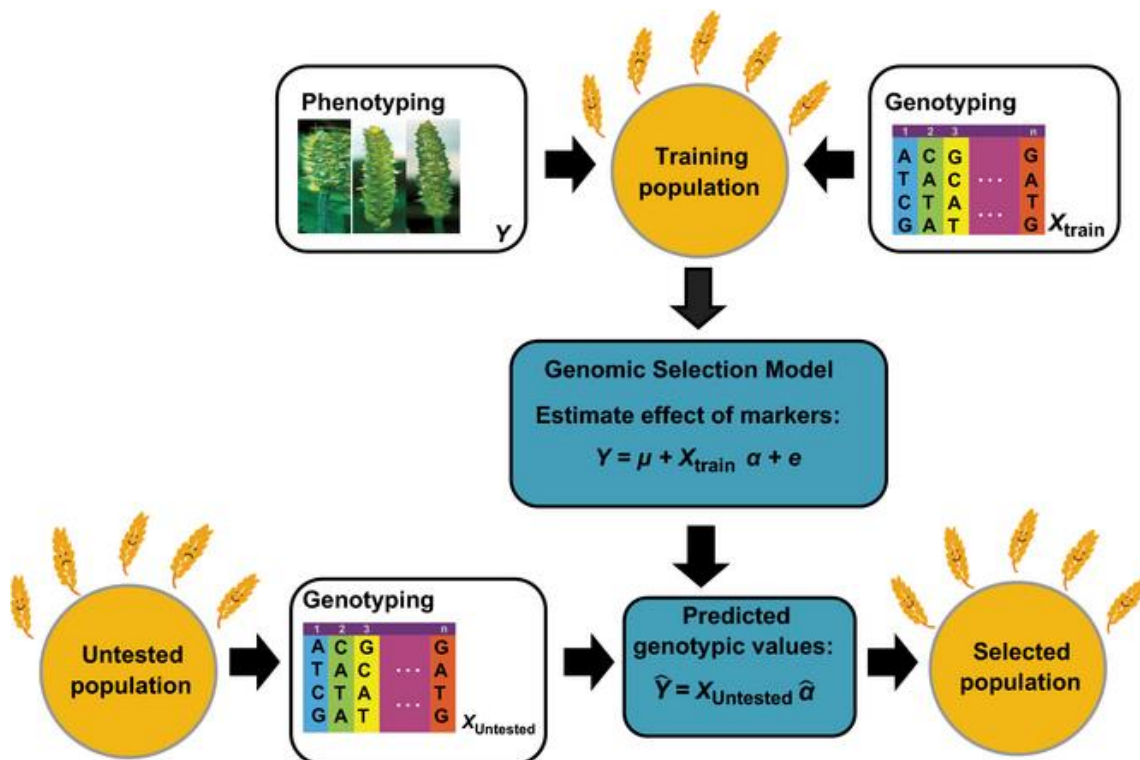


Figure D-3 : Principe de la sélection génomique (extrait de Zhao *et al.*, 2015).

La sélection génomique se décompose en deux étapes. Les données génétiques et phénotypiques sont collectées dans la population d'apprentissage et les effets à chacun des marqueurs moléculaires sont estimés (haut de la figure). Puis, les membres d'une population non testée sont seulement génotypés et sélectionnés sur la base de phénotypes prédits en fonction des effets estimés aux marqueurs au sein de la population d'apprentissage (bas de la figure).

Le dernier exemple évoqué ici concerne la plante modèle *Medicago truncatula*, et le pathogène *Aphanomyces euteiches*. A partir de 179 lignées naturelles de *Medicago truncatula*, l'étude de génétique d'association a permis de mettre en évidence le gène candidat Medtr3g011020 encodant une protéine F-BOX. Ce gène étant localisé au milieu du QTL *PRAE1* (135 kb) identifié par la même équipe quelques années auparavant, ils en ont fait un potentiel candidat à la résistance à *Aphanomyces euteiches* chez *Medicago truncatula* (Djébali *et al.*, 2009; Bonhomme *et al.*, 2013).

Nos travaux sur le contrôle génétique de la réponse à *Verticillium* chez *Medicago truncatula* ainsi que ces trois exemples illustrent l'utilité de mener à terme plusieurs méthodes d'analyses génétiques et transcriptomiques afin de disséquer le plus finement possible les différents traits phénotypiques étudiés ou de réduire au maximum les intervalles de confiance des QTLs associés aux traits d'intérêt. Néanmoins, puisque les études de génétique d'association et de QTLs réalisées à partir de populations biparentales ne permettent d'identifier que des loci à larges effets, la sélection génomique (GS) a été développée pour capturer la totalité de la variance génétique additive d'un trait quantitatif à l'échelle de son génome entier (Meuwissen *et al.*, 2001). En s'intéressant à l'ensemble du génome, la sélection génomique capture les effets d'un ensemble de loci et ne permet pas d'identifier en particulier des gènes candidats. Le principe de la GS est de prédire les valeurs génomiques estimées de sélection (genomic estimates breeding values, GEBVs) d'individus candidats en se basant uniquement sur leurs marqueurs génétiques (**Figure D-3**). Pour cela, une population d'apprentissage (ou training population) composée d'individus de génotypes à un grand nombre de marqueurs et phénotypes d'intérêt connus est utilisée afin de développer des modèles de prédiction les plus précis possibles (Poland and Rutkoski, 2016). Ces modèles sont ensuite appliqués à la sélection d'individus de génotype aux marqueurs connus formant la population test afin de prédire leurs phénotypes. Il existe différents modèles statistiques de prédiction des GEBVs tels que le G-BLUP (Genomic Best Linear Unbiased Prediction) ou le rr-BLUP (ridge regression Best Linear Unbiased Prediction) et comme pour la génétique d'association, ces modèles sont des modèles linéaires mixtes basés sur les équations d'Henderson (Henderson, 1984). En plus du progrès génétique pour différents traits d'intérêt agronomique, un autre avantage de cette méthode est un gain de temps dans les programmes de sélection, les plantes n'ont pas besoin d'être phénotypées à chaque génération, et celles qui possèdent un fort potentiel sont sélectionnées plus rapidement, réduisant ainsi le nombre de cycles d'autofécondation (Poland and Rutkoski, 2016).

Différentes études ont montré l'utilité des approches de GS et leur efficacité afin de capturer et de prédire les variations génétiques de la résistance quantitative aux maladies. Dans le cas de la résistance à la rouille noire (*Puccinia graminis*) chez le blé (*Triticum aestivum*), il existe des mécanismes de résistance quantitative et qualitative : beaucoup de gènes de résistances R race spécifique ont été détectés et sont efficaces au stade plantule, alors que la résistance à la rouille noire à des stades plus

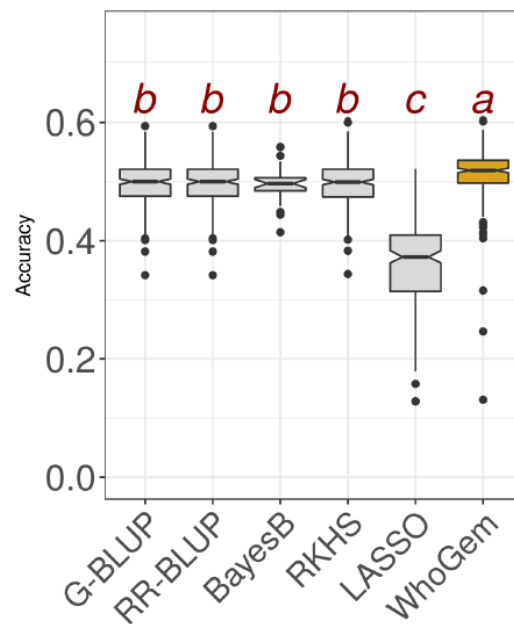


Figure D-4 : Précision de prédiction de la résistance à *Verticillium alfalfae* V31-2 chez *Medicago truncatula* de cinq algorithmes de prédiction génomique (G-BLUP, RR-BLUP, BayesB, RKHS, LASSO) et de WhoGEM (extrait de Gentzbittel *et al.*, soumis).

Les lettres représentent les groupes significativement différents obtenus avec un test de Kruskal-Wallis à 1%.

tardifs est quantitative (cette résistance est qualifiée de résistance plante adulte). En utilisant un modèle G-BLUP incluant le marqueur *Sr2* en effet fixe (marqueur flanquant un QTL majeur de résistance à la rouille noire chez le blé), une précision de prédiction de 0,56 à 0,62 est atteinte (Rutkowski *et al.*, 2014). Chez le maïs (*Zea mays*), dans le cadre de la résistance à *Setosphaeria turcica* (helminthosporiose), l'utilisation d'un modèle G-BLUP classique permet de prédire le phénotype de résistance à la maladie avec une précision de 0,706 (Technow *et al.*, 2013).

Dans le cadre du pathosystème *Medicago truncatula* / *Verticillium alfalfae*, les différents modèles de prédiction phénotypique couramment utilisés en GS ont été implémentés (Gentzbittel *et al.*, soumis). En fonction du modèle utilisé, une précision de prédiction de 0,38 pour la méthode LASSO à 0,5 pour les autres méthodes a été obtenue. En outre, nous avons développé à EcoLab un nouveau modèle de prédiction appelé WhoGem où les phénotypes sont prédits grâce à un modèle linéaire basé sur la proportion de génome ancestraux (ou admixture) au sein des différentes accessions. Huit génomes ancestraux ont été identifiés au sein de l'espèce *Medicago truncatula* à partir d'une sélection de plus de 800 000 SNPs. Des modèles linéaires utilisant la proportion de ces génomes ancestraux au sein des accessions ont été testés afin de prédire le phénotype MSS de réponse à l'inoculation par *Va* V31-2 chez *Medicago truncatula* (données obtenues dans le cadre de l'évaluation de la réponse à *Va* V31-2 de 246 accessions pour l'étude de génétique d'association présentée dans cette thèse). Le meilleur modèle de prédiction obtenu est basé sur les effets de quatre génomes ancestraux. Ce modèle de prédiction est significativement plus performant pour le caractère étudié que les modèles couramment utilisés en sélection génomique tels que G-BLUP, RR-BLUP ou LASSO (**Figure D-4**). Plus de 50% de la différence phénotypique entre les accessions résistantes et sensibles peut être expliquée avec ce modèle alors que l'analyse QTL explique 30% de la variation phénotypique observée et la substitution de l'acide aminé 423 de la protéine *MtSEC14* en explique 18,5%. Ceci tend également à montrer le contrôle génétique fortement polygénique de la résistance quantitative à *Verticillium alfalfae* chez *Medicago truncatula*.

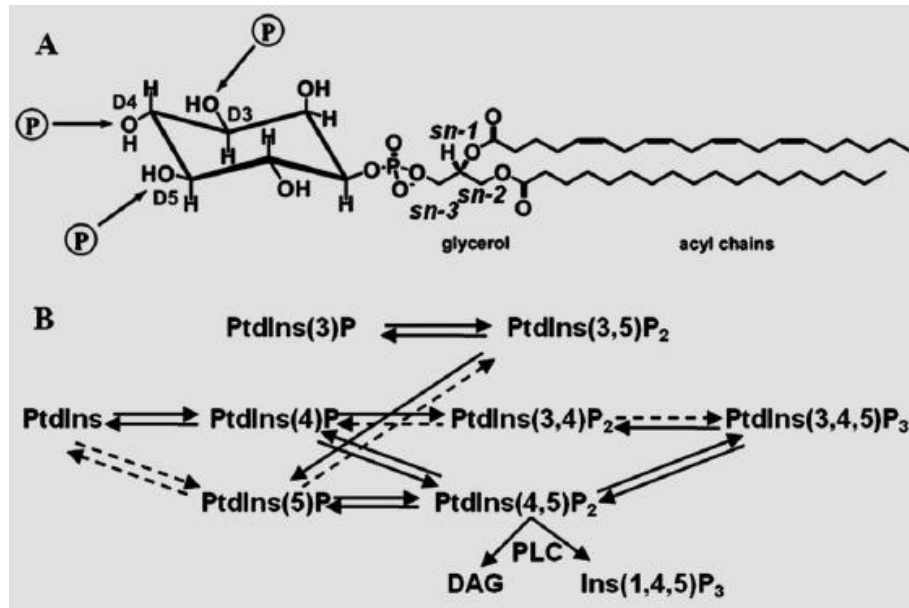


Figure D-5 : Représentation des différents types de phosphoinositides (extrait de Ghosh and Bankaitis, 2011).

A. Structure chimique du phosphatidylinositol (PtdIns). Le groupe phosphate de la tête inositol est estérifié au groupe hydroxyle *sn*-3 du glycérol. Les deux chaînes d'acyl gras de la molécule de phosphatidylinositol sont estérifiées aux groupes hydroxyles *sn*-1 et *sn*-2 du glycérol. Les groupes hydroxyles des positions D3, D4 et D5 de la tête inositol sont les sites de phosphorylation à l'origine des sept dérivés du PtdIns (aussi appelés phosphoinositides) présents chez les eucaryotes.

B. Réactions métaboliques générant les phosphoinositides et les dérivés de l'inositol à partir des Ptdins par les protéines kinases PtdIns, les phosphatases PtdIns et les phospholipases (PLC). Les réactions représentées par une flèche en pointillée ont été démontrées *in vitro* mais non observées *in vivo*.

II. Implication des protéines SEC14 dans le métabolisme des lipides

Afin de valider le rôle du gène *Medtr7g070480* codant pour une protéine SEC14 dans la résistance à la verticilliose chez *Medicago truncatula*, des racines transgéniques (ou « hairy-roots ») sous-exprimant ou sur-exprimant ce gène ont été générées dans les fonds génétiques A17 (résistant à *Va* V31-2) et F83005.5 (sensible à *Va* V31-2). La comparaison sept jours après inoculation de la colonisation des hairy roots issues des lignées A17 et F83005.5 a montré que ces racines étaient moins colonisées lorsque le gène *Medtr7g070480* était sous-exprimé. A l'inverse lorsque le gène est surexprimé, les racines transgéniques issues du fond génétique A17 sont plus colonisées que lorsque l'expression du gène n'est pas modifiée. Lorsque le gène est surexprimé dans les racines transgéniques issues de la lignée F83005.5, la différence de colonisation du pathogène par rapport au contrôle n'est pas significative. Ces résultats de validation fonctionnelle montrant une résistance accrue lorsque le gène candidat est sous-exprimé, nous conduisent à penser que le gène *Medtr7g070480* codant pour une protéine SEC14 serait un gène de sensibilité à *Verticillium alfalfae* V31-2 chez *Medicago truncatula*. D'une longueur de 436 acides aminés, deux domaines protéiques sont prédits (**Figure C-12-B**, page 218) : un domaine de liaison aux petites molécules lipophiles (SEC14) et un domaine GOLD (pour Golgi dynamics, domaine caractéristique de protéines de l'appareil de Golgi et des protéines lipidiques impliquées dans le trafic vésiculaire). L'association de ces domaines suggère que cette protéine SEC14 interagirait avec les membranes de l'appareil de Golgi.

1. Identification du rôle des protéines SEC14 chez les plantes

a. Les protéines SEC14, des protéines de transfert de phospholipides

Les phospholipides sont des éléments essentiels au fonctionnement cellulaire : ils sont des composants structuraux des membranes cellulaires, des réservoirs de second messager de diverses voies de signalisation, des régulateurs d'enzymes et de canaux à ions. Un exemple de l'implication des phospholipides dans ces multiples processus cellulaires est celui des phosphoinositides (phosphoinositol (PtdIns) phosphorylé, **Figure D-5-A**). Outre leur rôle de messager, ils contribuent à l'établissement de l'identité des organites, à leur intégrité et à leur fonction par régulation des canaux à ions, pompes et transporteurs en modulant la distribution des lipides, et plus généralement en régulant le métabolisme cellulaire grâce à leur relation avec les protéines de transfert de lipides et grâce à leur rôle dans le transport vésiculaire (endocytose et exocytose). Le métabolisme des phosphoinositides est connu et régulé par l'action conjointe de protéines kinases pour les produire, de phospholypases pour les hydrolyser et des lipides phosphatases pour les déphosphoryler (**Figure D-5-B**).

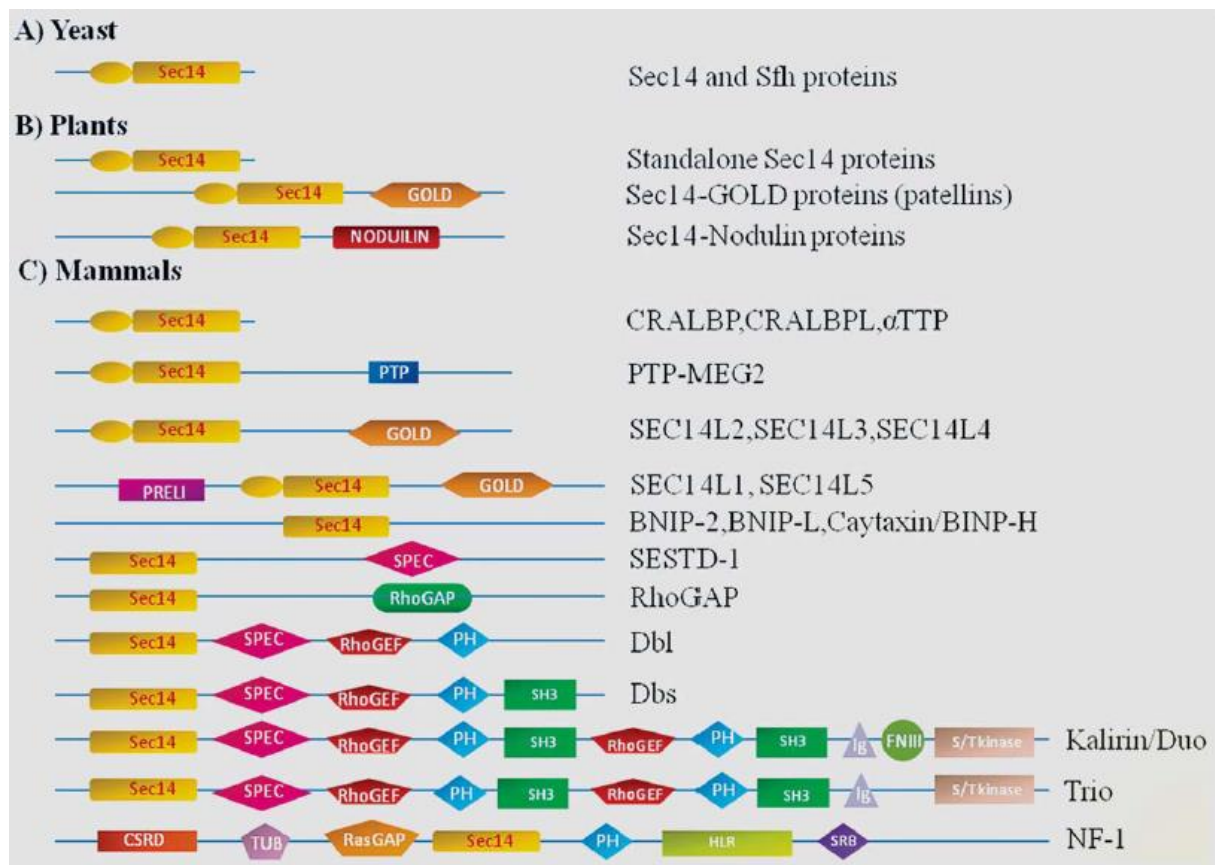


Figure D-6 : Domaines architecturaux des protéines de la famille des SEC14 chez les eucaryotes (extrait de Ghosh and Bankaitis, 2011).

Protéines représentant la famille des SEC14 chez la levure (A), les plantes (B) et les mammifères (C).

Le domaine SEC14 est représenté en jaune, son domaine N-terminal CRAL-TRIO est schématisé par un ovale lorsqu'il est présent.

Néanmoins, des questions demeurent sur la régulation de la voie de signalisation des phosphoinositols au sein des cellules eucaryotes ainsi que sur son intégration avec le métabolisme des lipides dans la transduction de signal et le trafic vésiculaire. L'identification de protéines de transfert de phosphatidylinositol/ phosphatidylcholine (PITPs, phosphatidylinositol/phosphatidylcholine transfer proteins) contribue à mettre en évidence la régulation des voies de signalisation des phosphoinositols (Ghosh and Bankaitis, 2011). Les PITPs « classiques » sont définies comme des protéines non enzymatiques contribuant au transfert des phosphatidylinositols (PtdIns) et phosphatidylcholines (PtdCho) dans la double couche lipidique membranaire *in vitro*. Les PITPs « non classiques » désignent les protéines gardant la capacité de liaison ou de transfert des PtdIns mais perdant ces capacités pour les PtdCho. Ces dernières sont au sein des organismes eucaryotes les plus nombreuses et illustrent la diversité des processus contrôlés par la voie des phosphonositides (Nile *et al.*, 2010). Comme les PtdIns, les PITPs exécutent d'importantes fonctions dans la régulation du métabolisme des phospholipides, dans le trafic membranaire, dans la polarisation de la croissance membranaire et dans la transduction de signal. Deux différentes familles protéiques composent les PITPs : les protéines SEC14 et les protéines START (StAR-related lipid transfer domain)(Nile *et al.*, 2010). Les protéines SEC14 sont présentes chez tous les organismes eucaryotes. Elles peuvent être composées uniquement du domaine SEC14 ou être associées à d'autres domaines fonctionnels tels que les domaines GOLD, Noduline, ou encore protéine kinase (S/T kinase, **Figure D-6**). Ces protéines SEC14 sont essentielles dans certains processus cellulaires et leurs mutations peuvent conduire à des maladies génétiques. Par exemple, chez l'homme des mutations au sein de la protéine hépatique de transfert de l' α -tocopherol (α -tocopherol binding protein (α TTP, protéine uniquement à domaine SEC14)) provoque l'ataxie par déficit isolé en vitamine E. Des mutations au sein de cette protéine empêchent le recyclage et le transfert de la vitamine E au sein de l'organisme, elle disparaît rapidement après absorption. Cette maladie dégénérative se caractérise notamment par des troubles de l'équilibre, une ataxie (mauvaise coordination des mouvements), une déficience visuelle, ou encore une arythmie cardiaque (Nile *et al.*, 2010).

b. Les protéines SEC14 chez les végétaux

Chez les plantes, la superfamille des protéines SEC14 est composée de protéines à domaine uniquement SEC14, à domaines SEC14-GOLD et à domaines SEC14-noduline (**Figure D-6**). Par exemple, chez *Arabidopsis thaliana*, 32 gènes appartenant à cette famille ont été annotés (14 gènes codent des protéines uniquement à domaine SEC14, 12 pour des protéines à domaine SEC14-noduline et 6 pour des protéines à domaines SEC14-GOLD). Chez *Medicago truncatula*, cette famille multigénique compte 36 membres encodant 18 protéines à domaines SEC14 uniques, 11 protéines à domaines SEC14-noduline et 7 protéines à domaines SEC14-GOLD (**Figure D-7**). Au vu de la diversité et du nombre de protéines SEC14 chez les plantes, l'étude fonctionnelle de cette famille est difficile. Néanmoins, le rôle

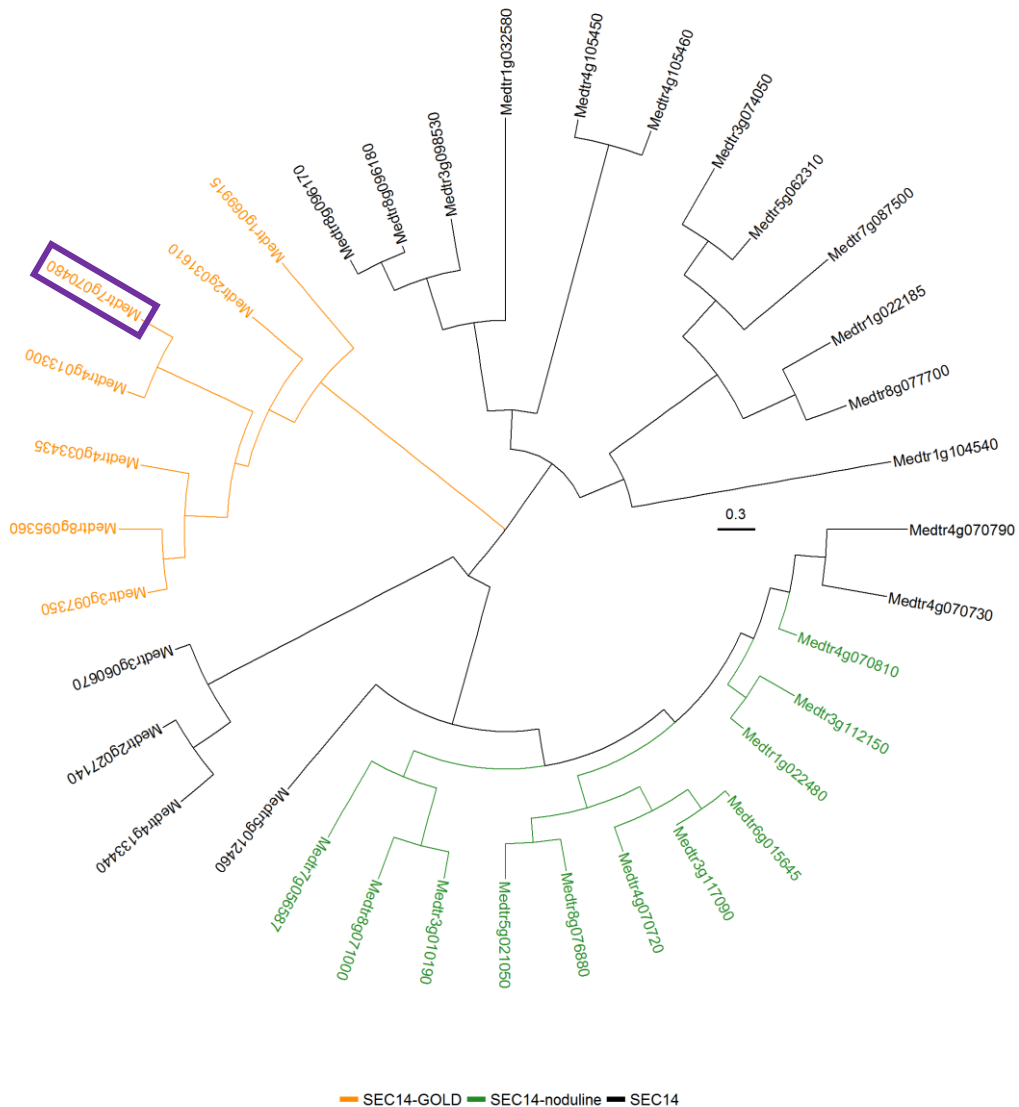


Figure D-7 : Arbre phylogénétique des protéines SEC14 de *Medicago truncatula*.

Les séquences protéiques ont été alignées avec l'outil en ligne Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). L'arbre phylogénétique a été calculé en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance et testé par la méthode Bootstrap. La représentation graphique de l'arbre a été réalisée en utilisant le package ggtree (Yu *et al.*, 2017a).

La barre d'échelle représente une modification de 0,3 acides aminés, le gène candidat validé est encadré en violet.

de certaines de ces protéines en réponse à des stress biotiques, abiotiques et dans la polarité membranaire a déjà été mis en évidence (Huang *et al.*, 2016).

c. Rôle des protéines uniquement constituées du domaine SEC14

Stress abiotiques

La première protéine exclusivement à domaine SEC14 a été décrite chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Cette dernière joue un rôle essentiel dans le transport protéique à partir du réseau *trans*-Golgi (biogénèse des vésicules) dont découle par exemple la coordination des voies de signalisation des lipides et des protéines impliquées dans la formation des vésicules. Elle se caractérise également par son activité de transfert membranaire des PtdIns et des PtdCho *in vitro* (Phillips *et al.*, 2006). En recherchant chez les plantes des gènes paralogues aux gènes de levures, un de ces gènes a été identifié chez *Arabidopsis thaliana*, et deux chez le soja (*Glycine max*). Le gène *AtPITP11* d'*Arabidopsis thaliana* est exprimé dans l'ensemble de la plante et sa protéine possède des propriétés de transfert membranaire des PtdIns *in vitro*. Aucune analyse fonctionnelle sur ce gène n'a été réalisée à ce jour, et l'existence d'un paralogue proche d'*AtPITP11* appelé *AtPITP12* pourrait compliquer cette étude en cas de redondance fonctionnelle (Jouannic *et al.*, 1998). Chez le soja, *SSH1* (Soybean Sec14 Homologs) est exprimé dans les racines et les feuilles alors que *SSH2* est exprimé dans les graines en développement. Les deux protéines encodées par ces gènes possèdent des propriétés de transfert de lipide *in vitro* différentes, *SSH2* comme *AtPITP11* peut prendre en charge les PtdIns alors que *SSH1* ne possède pas du tout d'activité de transfert des phospholipides. Chez un tabac exprimant constitutivement le gène *SSH1* du soja (fond génétique *Nicotiana tabacum* cv SR1) ainsi que chez la levure, en réponse à un stress hyperosmotique tel que le stress salin, *SSH1* est rapidement phosphorylé localement. Cette phosphorylation permet le relargage des protéines *SSH1* des membranes, suggérant ainsi que *SSH1* est mobilisée à partir des membranes en présence d'un stress osmotique afin d'envoyer au moins un signal par la voie des phosphoinositides, signal appartenant à un mécanisme plus large d'une voie de régulation osmotique cellulaire. De par l'homologie importante de séquences entre *SSH1* et *AtPIPT11*, les auteurs de cette étude ont émis l'hypothèse que *AtPIPT11* jouerait également un rôle dans la réponse à des stress abiotiques comme les stress osmotiques (Jouannic *et al.*, 1998; Monks *et al.*, 2001).

Chez le haricot *Phaseolus vulgaris* et *Medicago truncatula*, le miR1514a est accumulé en réponse au stress hydrique. La cible de ce microARN est un ARNm d'un facteur de transcription NAC (domaine NAC commun aux gènes NAM (no apical meristem), *AtAF1* and 2 (*Arabidopsis* transcription activation factor, and CUC2 (cup-shaped cotyledon)). Lorsque le miR1514a clive l'ARNm codant le facteur de transcription NAC 700, les fragments de cet ARNm sont recrutés par un complexe protéique composé

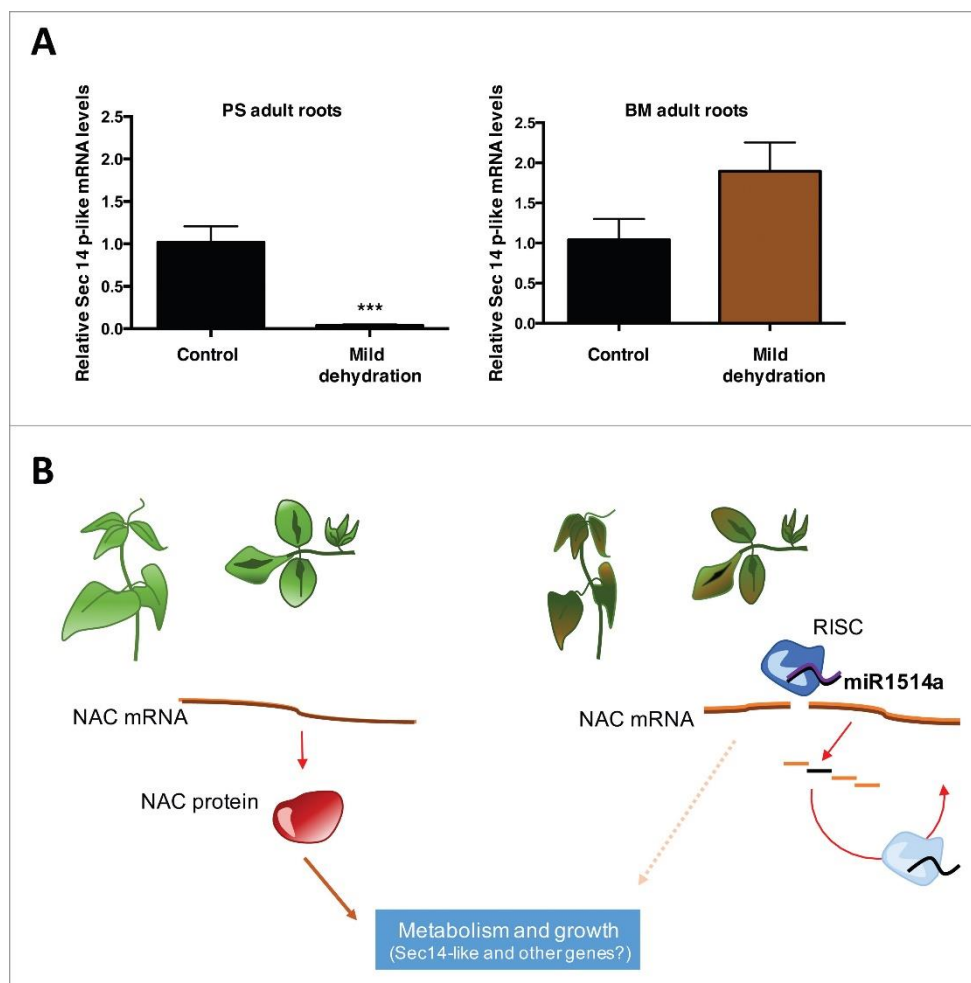


Figure D-8 : Modèle de la fonction du miR1514a chez les légumineuses (extrait de Sosa-Valencia *et al.*, 2017b).

A. La quantité d'ARNm codant la protéine SEC14 du haricot Phvul.006G137200 (*PvSEC14*) est réduite dans le cultivar PS (Pinto Saltillo, résistant à la sécheresse) mais pas dans le cultivar BM (MayoMadero, sensible à la sécheresse) dans les racines de plantes adultes en condition de stress hydrique. Les plantes adultes ont été soumises à un niveau d'irrigation normal ou à une condition de stress hydrique moyen (irrigation au niveau de la moitié de la capacité au champ pendant 13 jours). Le niveau d'expression des ARNm a été normalisé par rapport à l'ARNm *Skp16*. Les astérisques indiquent une différence significative comparée au contrôle (p-value <0,001).

B. Dans des conditions de croissance normale, le facteur de transcription NAC 700 régule des processus liés à la croissance et au métabolisme, incluant peut-être le gène Phvul.006G137200. En réponse au stress hydrique, le miR1514a régule de façon négative le facteur de transcription NAC 700 et provoque la formation de phasiARN chez les légumineuses.

de SGS3 (suppressor of gene silencing) et RDR6 (RNA dependent RNA polymerase) afin de former des ARN double brin. La protéine DCL4 (Dicer-like 4) clive ensuite ces ARNs afin de former des phasiARN dont la fonction n'est pour l'instant pas décrite. En réponse à l'inhibition du miR1514a dans des racines transgéniques de *Phaseolus vulgaris*, l'ARNm du NAC 700 est accumulé et provoque notamment l'accumulation de la protéine PvSEC14 codée par le gène Phvul.006G137200. De plus, l'expression de PvSEC14 est naturellement réduite lorsque le haricot résistant à la sécheresse Pinto Saltillo est en condition de stress hydrique (**Figure D-8**). Les auteurs de cette étude ont donc émis l'hypothèse que PvSEC14 serait un gène impliquée dans la tolérance à la sécheresse (Sosa-Valencia *et al.*, 2017a,b).

Le rôle dans la résistance aux stress abiotiques des protéines SEC14 a également été étudié chez le maïs : la surexpression de ZmSEC14 chez *Arabidopsis thaliana*, confère une tolérance au froid (Wang *et al.*, 2016b).

Stress biotiques

Chez le tabac, l'expression du gène NbSEC14 est induite lorsque la plante est inoculée par infiltration foliaire par la bactérie du sol *Ralstonia solanacearum* Rs0E1-1 (souche virulente) et Rs8107 (souche avirulente) avec des pics d'expression entre 3 et 48 heures après inoculation (Kiba *et al.*, 2012). De plus, les plantes pour lesquelles l'expression de NbSEC14 est réduite par VIGS (Virus Induced Gene Silencing) et qui sont inoculées par Rs0E1-1 montrent une augmentation d'un facteur x10 de la charge bactérienne trois jours après inoculation et une mort de la plante en 13 jours au lieu de 16 jours pour les plantes dont l'expression de ce gène n'est pas modifiée. Une caractérisation *in vitro* de NbSEC14 chez la levure a montré que cette protéine a la capacité de transférer les PtdIns et les PtdCho. L'induction de NbSEC14 par l'inoculation par *Ralstonia solanacearum* Rs8107 provoque également une augmentation de l'activité de la voie de l'acide jasmonique (gène PR4) 24 heures après inoculation, ainsi que les voies de signalisation des lipides impliquant les phospholipases C et D et des kinases diacylglycérol (Kiba *et al.*, 2014). Le rôle de la protéine NbSEC14 dans l'immunité des plantes a aussi été étudié en inoculant des plantes sous-exprimant le gène NbSEC14 par deux pathogènes foliaires *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* et *Pseudomonas syringae* pv. *mellea*. Dans cet exemple, la voie de l'acide jasmonique a été de nouveau compromise et les symptômes nécrotiques sur feuilles sont apparus plus rapidement sur ces plantes par rapport à celles dont l'expression de NbSEC14 n'était pas modifiée (Kiba *et al.*, 2016). L'ensemble de ces résultats suggère que NbSEC14 jouerait un rôle dans la régulation de la résistance basale chez le tabac.

d. Protéines à domaine SEC14-GOLD

Le gène candidat validé Medtr7g070480 identifié par les analyses GWAS code pour une protéine SEC14 de ce type.

Les protéines à domaines SEC14-GOLD ont été découvertes chez la courgette (*Cucurbita pepo*) puis chez *Arabidopsis thaliana* qui en compte six classes (PATL1 à PATL6), elles sont aussi nommées patellines. AtPATL1, la patelline la mieux caractérisée, jouerait un rôle dans la division cellulaire lors de la formation de la plaque équatoriale. Néanmoins les mécanismes moléculaires impliquant cette protéine ne sont pas connus (Peterman *et al.*, 2004). Une analyse protéomique par 2D-DIGE (two-dimensional difference gel electrophoresis) sur de jeunes plantules d'*Arabidopsis thaliana* a mis en évidence 42 protéines régulées par la voie hormonale des brassinostéroïdes (hormones impliquées dans la croissance de la plante) dont les patellines AtPATL1, AtPATL2 et AtPATL4. L'analyse de l'expression des gènes codant les protéines régulées par la voie des brassinostéroïdes dans des mutants de cette voie hormonale a également montré une diminution de l'expression des gènes AtPATL1 et AtPATL2 par rapport à la plante sauvage lorsque les plantes sont soumises à ce traitement hormonal. Ces résultats suggèrent que ces deux gènes jouent un rôle central dans la voie de signalisation des brassinostéroïdes chez *Arabidopsis thaliana* (Deng *et al.*, 2007).

Afin d'identifier des mécanismes de résistance à la mosaïque de la luzerne (AMV pour Alfalfa Mosaic Virus), une étude a été menée pour identifier des protéines d'*Arabidopsis thaliana* interagissant avec la protéine de mouvement (MP) de ce virus (ces protéines sont nécessaires à l'établissement de l'infection systémique en permettant les mouvements à travers les plasmodesmes grâce à des interactions avec des protéines de plante hôte et d'autres facteurs de virulence). Pour cela, un criblage double hybride chez la levure a été effectué en utilisant la protéine MP de l'AMV et une banque d'ADNc réalisée à partir de feuilles d'*Arabidopsis thaliana*. Parmi les protéines interagissant avec la MP, les patellines AtPATL3 et AtPATL6 ont été identifiées. La localisation intracellulaire de ces protéines a permis de mettre en évidence leur interférence avec la protéine MP en l'empêchant de progresser vers les plasmodesmes, limitant ainsi la propagation de l'infection. L'étude de mutants knock-out d'*Arabidopsis thaliana* dans chacun de ces gènes et dans le double mutant a permis de montrer une augmentation de la charge virale au sein des plantes ainsi qu'une plus grande sensibilité des plantes (Peiro *et al.*, 2014).

e. Protéines à domaines SEC14-noduline

Les protéines à domaines SEC14-noduline ont été découvertes chez *Lotus japonicus* : les gènes encodant ces protéines sont surexprimés lors de la nodulation (Kapranov *et al.*, 1997). Ces protéines ne sont pas présentes que chez les légumineuses, mais elles sont spécifiques aux angiospermes. La

protéine AtSFH1 (SEC Fourteen Homologues 1) intervient dans la régulation de la polarité des transferts des vésicules membranaires racinaires et plus précisément dans la croissance des poils absorbants. En effet, le gène *AtSFH1* est spécifiquement exprimé dans les racines, et les mutants knock-out dans ce gène produisent des poils absorbants anormaux, trapus et possédant souvent deux ou trois méristèmes en croissance. Chez les plantes sauvages, un gradient croissant de la quantité de la protéine AtSFH1 est observable de la base du poil absorbant à son extrémité, où la concentration en vésicules cytoplasmiques est la plus importante. Le phénotype du mutant correspond à l'absence du gradient de PtdIns-4,5-P₂ au sein du poil absorbant en croissance, à une perte de vésicules membranaires à l'extrémité du poil absorbant et à une modification du réseau de microfilaments d'actine (contrôlé par les phosphoinositides) et des microtubules du cytosquelette. Le système très polarisé du transport des vésicules s'effondre, les vésicules transportent anarchiquement leur contenu tel que les transporteurs ou les canaux à ions vers la membrane cytoplasmique (Vincent *et al.*, 2005).

Chez le riz, le gène *OsSNBP1* (Sec14-nodulin domain containing protein 1) est nécessaire à la biogénèse des poils racinaires et il serait également impliqué dans la formation du tube pollinique (Huang *et al.*, 2013). *AtSH3* et *AtSH12* ont des niveaux d'expressions élevés dans les fleurs et dans le pollen (Mo *et al.*, 2007). Ces protéines sont donc préférentiellement exprimées dans les tissus à forte croissance polarisée, c'est-à-dire au niveau de la croissance des extrémités des plantes, théâtre d'une intense activité vésiculaire (Huang *et al.*, 2016). A ce jour, aucune protéine à domaine SEC14-noduline n'a été décrite comme ayant un rôle dans le système immunitaire des plantes.

f. Bilan sur le rôle de protéines SEC14 dans la réponse des plantes avec pathogènes

Ces différentes études mettent notamment en évidence le rôle des protéines à domaine SEC14 et à domaine SEC14-GOLD dans des réponses aux stress biotiques. Chez le tabac, le gène *NbSEC14* (encodant une protéine uniquement à domaine SEC14) serait un gène de résistance basale. En effet, il confère une résistance à la bactérie racinaire *Ralstonia Solanacearum* et aux pathogènes foliaires *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* et *Pseudomonas syringae* pv. *mellea*. De plus, cette résistance impliquerait la voie de signalisation de l'acide jasmonique : le gène *PR4* est significativement induit 24 heures après inoculation chez la plante sauvage alors qu'il n'est plus induit lorsque l'expression du gène *NbSEC14* est réduite (Kiba *et al.*, 2012, 2014, 2016). Dans le pathosystème *Medicago truncatula* / *Verticillium alfalfae*, Medtr7g070480 est un gène de sensibilité et aucune induction de l'expression de *PR4* 24 heures après inoculation chez un ensemble de lignées sensibles et résistantes à *Va* V31-2 n'a été observée (**Tableau C-19**, page 270). Néanmoins, l'étude transcriptomique réalisée chez la lignée sensible F83005.5 a notamment montré une induction de la voie de l'acide jasmonique entre 4 et 24 heures après inoculation par *Va* V31-2 alors qu'elle n'est pas observée chez la lignée résistante A17

(Toueni *et al.*, 2016). Ces données pourraient suggérer un possible rôle de la protéine SEC14 de *Medicago truncatula* encodée par le gène Medtr7g070480 (*MtSEC14*) dans la voie de signalisation de l'acide jasmonique, pouvant amener à la sensibilité de *Medicago truncatula* à *Verticillium alfalfae*.

Chez *Arabidopsis thaliana* le gène *AtPATL6* est un des gènes qui confèrent une résistance accrue au virus de la mosaïque de la luzerne en entravant la diffusion des protéines de mouvement MP par les plasmodesmes (Peiro *et al.*, 2014). Il est intéressant de noter que la protéine *AtPATL6*, localisée au niveau des membranes cytoplasmiques, est une protéine SEC14-GOLD dont le plus proche homologue chez *Medicago truncatula* est Medtr7g070480 (70% d'homologie de séquences). *MtSEC14* pourrait donc également interagir avec un/des éliciteur(s) issu(s) de *Va* V31-2. Cet hypothétique éliciteur reconnaîtrait la protéine *MtSEC14*, ce qui activerait la voie de l'acide jasmonique et conduirait à la sensibilité de *Medicago truncatula* à *Verticillium alfalfae*. Afin de valider une de ces hypothèses, une localisation cellulaire de la protéine Medtr7g070480 et de ces partenaires hypothétiques ainsi qu'une étude plus approfondie de l'implication de l'acide jasmonique dans la sensibilité à *Va* V31-2 chez *Medicago truncatula* seraient nécessaires. En effet, si l'étude transcriptomique réalisée à des temps précoces met en évidence une implication de l'acide jasmonique chez la lignée sensible F83005.5, des essais d'inoculation après un pré-traitement de plantes au méthyl-jasmonate ont été réalisés et aucune différence de développement de la maladie ou de poids des parties aériennes n'a été observée entre les plantes inoculées et les plantes contrôles (alors que les gènes de la voie de l'acide jasmonique ont bien été activés) (Toueni, 2014).

2. Rôle des lipides dans la résistance aux pathogènes

Comme vu précédemment, en tant que PITPs, les protéines SEC14 sont plus généralement liées au métabolisme lipidique (biosynthèse, transport et transduction de signal) (Saito *et al.*, 2007; Nile *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2016). Les acides gras et les métabolites dérivés des acides gras font partie de la classe des lipides mais ils ne sont pas uniquement des éléments de la structure cellulaire, ils jouent également un rôle de transducteur de signal après détection d'un stress par les cellules. En effet, les acides gras peuvent être des seconds messagers ou encore réguler la transduction de molécules ou des facteurs de transcription. Dans la plupart des cas, le rôle des acides gras correspond à des modifications de composition et de fluidité des membranes lipidiques grâce à des désaturases, ce qui peut altérer la fonction des protéines membranaires et les voies de signalisation cellulaire. En plus de leur implication dans la signalisation structurelle des messages, les acides gras possèdent des fonctions régulatrices en constituant des précurseurs de lipides bioactifs tels que les oxylipines comme l'acide jasmonique. Chez l'homme, certains acides gras peuvent également moduler la transduction de signal en fonctionnant comme des hormones hydrophobes se liant et régulant l'activité de protéines réceptrices de réseaux de régulation impactant le métabolisme cellulaire. Ainsi, l'acide arachidonique (20:4) et ses métabolites sont cytotoxiques pour les cellules du cancer du colon : la présence de cet acide gras entraîne la surexpression de facteurs de transcription liés à la mort cellulaire alors que des facteurs de transcription jouant un rôle dans la survie cellulaire sont sous-exprimés (Monjazebe *et al.*, 2006). Pour finir, les acides gras peuvent également interagir avec divers facteurs de transcription. Cet effet des acides gras sur l'expression des gènes a également été identifié sur les mécanismes de régulation post-transcriptionnels comme la digestion des ARNm. Par exemple, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* en présence d'un excès d'acide gras insaturé dans le milieu, la durée de vie de l'ARNm du gène *OLE1* encodant une Δ -9 désaturase est divisée par quatre (Gonzalez and Martin, 1996). La suite de ce paragraphe sera réduit aux rôles des lipides dans la résistance aux pathogènes chez les plantes, et plus précisément sur leur rôle en tant que composé anti-microbien et messenger (Walley *et al.*, 2013).

a. Rôle antimicrobien des acides gras

L'expression du gène Δ -9 désaturase de la levure chez l'aubergine (*Solanum melongena*) et la tomate (*Solanum lycopersicum*) provoque une augmentation du contenu cellulaire en acide gras 16:1, 16:3 et 18:1. Cela s'explique par l'activité enzymatique de la Δ -9 désaturase : les acides gras sont synthétisés dans la plante sous forme saturée et la première insaturation est catalysée par cette enzyme. Ces modifications retardent l'apparition des symptômes de maladie causés par *Erysiphe polygoni* (oïdium) chez la tomate et par *Verticillium dahliae* chez l'aubergine de deux jours. De plus, des tests *in*

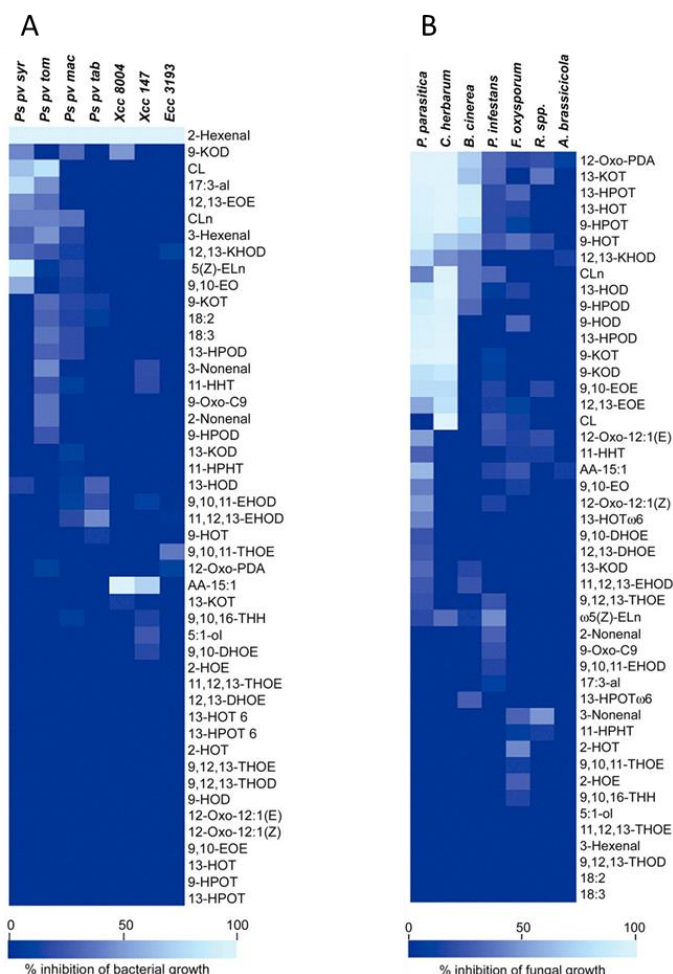


Figure D-9 : Activité antibactérienne (A) et antifongique/antioomycètes (B) des oxylipines (extrait de Prost *et al.*, 2005).

Chaque souche de micro-organisme a été exposée à 100μM de chaque composé et de l'éthanol (contrôle) pendant 24 heures dans un milieu liquide approprié. Le pourcentage d'inhibition de croissance a été calculé par rapport au contrôle suivant la formule $100 \times (\text{croissance en présence d'oxylipine} / \text{croissance en présence d'éthanol})$. Sur ces diagrammes, l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à l'activité inhibitrice de l'oxylipine envers l'organisme.

2-HOE : acide 2(R,S)-Hydroxy-9(Z)-octadécenoïque; 2-HOT : acide 2(R)-Hydroxy-9(Z),12(Z),15(Z)-octadécatrienoïque; 17:3-al : 8(Z),11(Z),14(Z)-Heptadécatrienal; 9-HPOT : acide 9(S)-Hydroperoxy-10(E),12(Z),15(Z)-octadécatrienoïque; 9-HPOT : acide 9(S)-Hydroperoxy-10(E),12(Z)-octadécadienoïque; 11-HPHT : acide 11(S)-Hydroperoxy-7(Z),9(E),13(Z)-hexadécatrienoïque; 13-HPOTw6 : acide 13(S)-Hydroperoxy-6(Z),9(Z),11(E)-octadécatrienoïque; 13-HPOT : acide 13(S)-Hydroperoxy-9(Z),11(E),15(Z)-octadécatrienoïque; 13-HPOT : acide 13(S)-Hydroperoxy-9(Z),11(E)-octadécadienoïque; 9-HOT : acide 9(S)-Hydroxy-10(E),12(Z),15(Z)-octadécatrienoïque; 9-HOD : acide 9(S)-Hydroxy-10(E),12(Z)-octadécadienoïque; 11-HHT : acide 11(S)-Hydroxy-7(Z),9(E),13(Z)-hexadécatrienoïque; 13-HOTw6 : acide 13(S)-Hydroxy-6(Z),9(Z),11(E)-octadécatrienoïque; 13-HOT : acide 13(S)-Hydroxy-9(Z),11(E),15(Z)-octadécatrienoïque; 13-HOD : acide 13(S)-Hydroxy-9(Z),11(E)-octadécadienoïque; 9-KOT : acide 9-Keto-10(E),12(Z),15(Z)-octadécatrienoïque; 9-KOD : acide 9-Keto-10(E),12(Z)-octadécadienoïque; 13-KOT : acide 13-Keto-9(Z),11(E),15(Z)-octadécatrienoïque; 13-KOD : acide 13-Keto-9(Z),11(E)-octadécadienoïque; 9,10-EO : acide (±)-cis-9,10-Epoxyoctadécanoïque; 9,10-EOE : acide 9(R),10(S)-Epoxy-12(Z)-octadécenoïque; 12,13-EOE : acide 12(R),13(S)-Epoxy-9(Z)-octadécenoïque; 9,10-DHOE : acide (±)-threo-9,10-Dihydroxy-12(Z)-octadécenoïque; 12,13-DHOE : acide (±)-threo-12,13-Dihydroxy-9(Z)-octadécenoïque; 9,10,16-THH : acide 9,10,16-Trihydroxyhexadécanoïque; 12-Oxo-PDA : acide 12-Oxo-10,15(Z)-phytyldienoïque; 12,13-KHOD : acide 13-Hydroxy-12-keto-9(Z),15(Z)-octadécadienoïque; 2-Hexenal : 2(E)-Hexenal; 3-Hexenal : 3(Z)-Hexenal; 2-Nonenal : 2(E)-Nonenal; 3-Nonenal : 3(Z)-Nonenal; 9-Oxo-C9 : acide 9-Oxononanoïque; 12-Oxo-12:1(Z) : acide 12-Oxo-9(Z)-dodécenoïque; 12-Oxo-12:1(E) : acide 12-Oxo-10(E)-dodécenoïque; 5:1-ol : 1-Penten-3-ol; CLn : acide Colnelénique; CL : acide Colneléique; ω5(Z)-ELn : acide ω5(Z)-Etherolénique; 9,10,11-EHOD : 10(S),11(S)-Epoxy-9(S)-hydroxy-12(Z),15(Z)-octadécadienoate; 11,12,13-EHOD : 11(S),12(S)-Epoxy-13(S)-hydroxy-9(Z),15(Z)-octadécadienoate; 9,12,13-THOD : acide 9(S),12(S),13(S)-Trihydroxy-10(E),15(Z)-octadécadienoïque; 9,12,13-THOE : acide 9(S),12(S),13(S)-Trihydroxy-10(E)-octadécenoïque; 9,10,11-THOE : acide 9(S),10(S),11(R)-Trihydroxy-12(Z)-octadécenoïque; 11,12,13-THOE : acide 11(R),12(S),13(S)-Trihydroxy-9(Z)-octadécenoïque; AA-15:1 : acide 6-[8(Z)-Pentadécenyl]salicylic.

vitro ont notamment montré que les acides gras 16:1 et 18:1 inhibent la croissance de *Verticillium dahliae*, ce qui a permis aux auteurs de cette étude d'émettre l'hypothèse d'une activité antimicrobienne de ces acides gras (Ababouch *et al.*, 1992) et de leur implication dans des mécanismes de défense basale des plantes (Wang *et al.*, 1998; Xing and Chin, 2000). Cette hypothèse a depuis fait l'objet de nouveaux travaux : l'activité antimicrobienne des acides gras linoléiques et linoléniques ainsi que de certains de leurs dérivés oxylipines (soit au total 43 différents composés) a été testée *in vitro* sur sept souches bactériennes (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, 2 souches de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* et *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*), cinq champignons (*Cladosporium herbarum*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus* sp. et *Alternaria brassicicola*), et deux oomycètes (*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* et *Phytophthora infestans*). Ainsi, on peut noter que les acides gras linoléiques et linoléniques ont également une activité antibactérienne en inhibant la croissance de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* et *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*. Le 13-HPOD (acide 13(S)-Hydroperoxy-9(Z),11(E)-octadecadiénoïque) possède une activité antimicrobienne modérée envers *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* et *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* ainsi qu'une activité plus importante envers *Cladosporium herbarum* et *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* (**Figure D-9**). Cette étude permet également de constater que certaines de ces molécules possèdent un spectre d'action plutôt large, ne s'arrêtant pas à un unique genre ou espèce de pathogène tels que les acides gras linoléiques et linoléniques (Prost *et al.*, 2005).

Outre son rôle antimicrobien notamment identifié chez *Verticillium*, l'acide palmitoléique (16:1) accompagné de l'acide palmique (16:0) joue un rôle important dans l'établissement de la relation de symbiose mycorhizienne entre la carotte (*Daucus carota* subsp. *sativus*) et le biotrophe obligatoire *Gigaspora intraradices*. En effet, la production d'acide gras de ce dernier est entièrement dépendante de celle de sa plante hôte (Trépanier *et al.*, 2005).

b. Rôle messenger des acides gras

En plus d'un rôle antimicrobien, d'autres études ont suggéré que les quantités d'acide oléique (18:1) dans les chloroplastes étaient importantes pour une réponse immunitaire normale contre les agents pathogènes en participant à la mort cellulaire et à la réponse systémique acquise (SAR). Par exemple, une mutation dans l'enzyme cytoplasmique FAB2 (Fatty Acid Biosynthesis 2) permettant la conversion de l'acide stéarique (18:0) en acide oléique (18:1) chez *A. thaliana* provoque l'activation constitutive de la voie de l'acide salicylique et la répression de la voie de l'acide jasmonique ayant pour conséquences l'expression de gènes liés à la pathogénicité (*PR*), la mort cellulaire spontanée, l'augmentation de la résistance à *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, à *Peronospora parasitica*, au virus

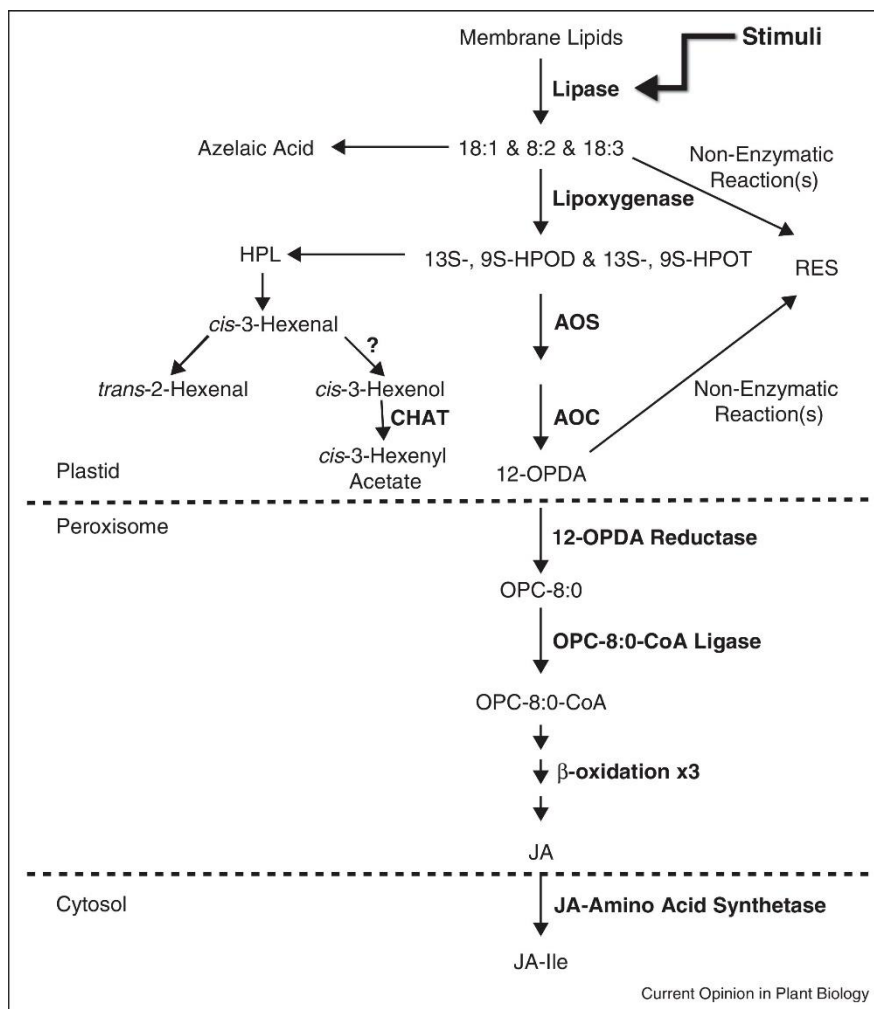


Figure D-10 : Voies enzymatiques et non enzymatiques permettant la synthèse des signaux dérivés des acides gras (extrait de Walley *et al.*, 2013).

18:1 : acide oléique ; 18:2 : acide linoléique ; 18:3 : acide linolénique ; 9S-HPODE : acide 9S-hydroperoxylinoléique ; 13S-HPODE : acide 13S-hydroperoxylinoléique ; 9S-HPOTE : acide 9S-hydroperoxylinolénique ; 13S-HPOTE : acide 13S-hydroperoxylinolénique ; HPL : hydroperoxyde lyase, CHAT ; acetyl CoA : cis-3-hexanol acetyltransférase ; AOS : allène oxyde synthase ; AOC : allène oxyde cyclase ; RES : espèces électrophiles réactives ; 12-OPDA : acide 12-oxophytodienoïque ; OPC-8:0 : acide 3-oxo-2-(cis-2'-pentenyl)-cyclopentane-1-octanoïque ; OPC-8:0-CoA : 3-oxo-2-(cis-2'-pentenyl)-cyclopentane-1-octanoyl CoA.

de la mosaïque du concombre et la sensibilité à *Botrytis cinerea* (Kachroo *et al.*, 2001; Nandi *et al.*, 2003; Kachroo *et al.*, 2003; Nandi *et al.*, 2005). De plus, il a été démontré que l'acide oléique est un messenger lipidique de stress biotique qui agit *via* la voie de l'oxyde nitrique chez *A. thaliana* en réponse à *P. syringae* pv. *tomato* DC3000. En effet, une réduction de la production d'acide oléique (chez un mutant dans le gène *FAB2*) provoque une accumulation d'oxyde nitrique (NO) et la sensibilité à *P. syringae* pv. *tomato* DC3000. L'étude du double mutant dans les gènes *FAB2* et *NOA1* (Nitric Oxide Associated 1, gène codant une enzyme intervenant dans la biosynthèse du NO) permet la restauration du phénotype de résistance d'*Arabidopsis thaliana* à *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (Mandal *et al.*, 2012).

L'acide α -linoléique (18:3), issu des membranes chloroplastiques est aussi un composé messenger. En effet, c'est un précurseur de l'acide oxo-phytodiénoïque, au sein de la voie de biosynthèse de la lipoxygénase, qui est à son tour un précurseur de l'acide jasmonique et du méthyl jasmonate, hormone participant à la défense des plantes contre les agents pathogènes (**Figure D-10**, Upchurch, 2008; Walley *et al.*, 2013). Ainsi par exemple, l'étude de mutants knock-out dans le gène *LOX1* d'*Arabidopsis thaliana* encodant une lipoxygénase exclusivement exprimée dans les cellules de garde des stomates a mis en évidence le rôle de cette enzyme et de ses substrats (18:1, 18:2, 18:3) dans le contrôle de la fermeture des stomates lorsque la plante est soumise à un stress biotique (infection d'*Arabidopsis thaliana* par *P. syringae* pv. *tomato* DC3000) (Montillet *et al.*, 2013).

c. Bilan du rôle des acides gras dans la résistance aux pathogènes

Les deux principaux rôles des acides gras dans la résistance aux pathogènes sont leur rôle antimicrobien et de précurseurs des voies de signalisation hormonale. Au vu des résultats obtenus chez l'aubergine après inoculation par *Verticillium dahliae* et sachant que les protéines SEC14 sont liées au métabolisme des lipides, des acides gras pourraient également jouer un rôle similaire dans la résistance à *Verticillium alfalfae* chez *Medicago truncatula*.

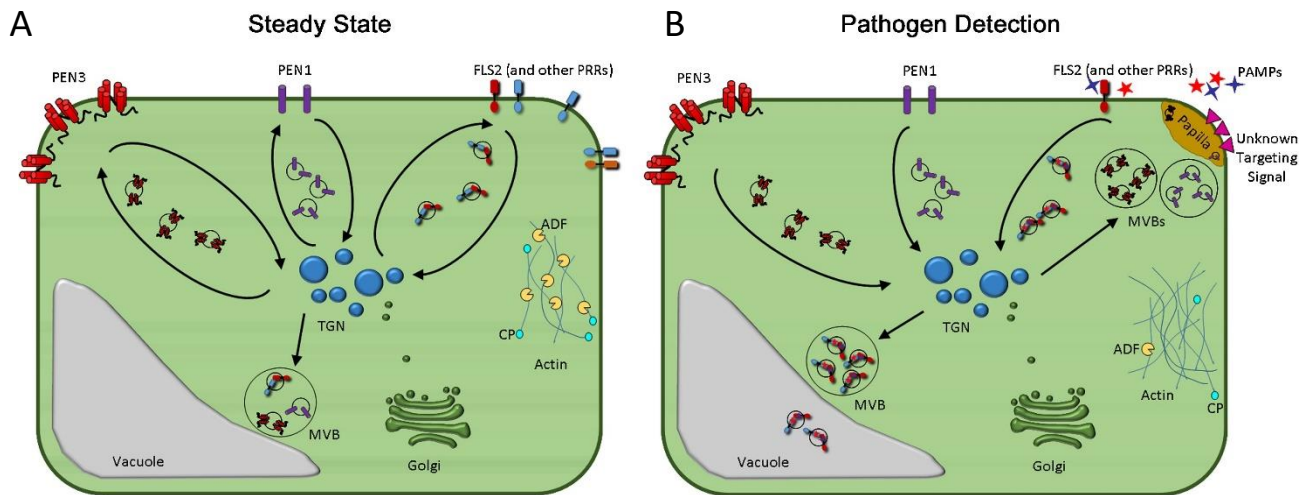


Figure D-11 : Modèle simplifié de la dynamique protéique et vésiculaire dans le système immunitaire végétal (extrait de Underwood, 2016).

A. Le schéma illustre un stade cellulaire où les défenses immunitaires ne sont pas activées. Les PRRs (pattern recognition receptors) tels que FLS2 et les protéines associées aux mécanismes de défense PEN1 et PEN3 sont recyclées en continu de la membrane plasmique au réseau *trans*-golgi (TGN, *trans*-Golgi network). La maturation du corps multi-vésiculaire (MVB) s'effectue dans le TGN puis celui-ci est évacué par vésicule vers la vacuole pour dégradation. La dynamique des microfilaments d'actine du cytosquelette est modulée par les protéines ADFs (Actin Depolymerizing Factor) et CP (Capping Protein).

B. Le schéma de gauche illustre les changements cellulaires observés après détection de PAMPs. Les protéines PRRs activées sont endocytées et évacuées vers la vacuole par le TGN/LE (late endosome) et par les MVBs. Le recyclage des PEN1 et PEN3 membranaires s'effectue vers le site de détection du pathogène, présumé marqué par un signal inconnu. Les modifications du trafic membranaire lors de la PTI illustrent l'importance présumée d'un complexe inconnu permettant la destruction ou le recyclage de protéines au sein du TGN et des MVBs. PEN1 et PEN3 et d'autres composés de défense seraient exportés dans les papilles des exosomes dérivés de la fusion entre des MVBs avec la membrane plasmique. Des modifications de densité et de dynamique des microfilaments d'actine sont observées à cause d'une inhibition des ADFs et CP.

3. Rôle des mouvements de vésicules dans les interactions plantes-pathogènes

Le domaine GOLD de la protéine SEC14 de *Medicago truncatula* est notamment caractéristique de protéines liées au trafic vésiculaire. Dans les interactions plantes-pathogènes, ce trafic est à la fois important pour l'agent pathogène comme pour l'hôte : les protéines liées à la défense de l'hôte et à la pathogénicité du micro-organisme doivent être délivrées au bon endroit et au bon moment (Wang *et al.*, 2016a).

a. Mouvements vésiculaires chez les plantes en réponse aux pathogènes

Que ce soit lors de la PTI ou de l'ETI, de nombreuses protéines de l'hôte (récepteurs immunitaires, activation et transduction de messages de défense, exécution du message) interviennent dans la mise en place des défenses de la plante. Les cellules végétales étant compartimentées, il est nécessaire pour la cellule hôte de déployer ses défenses au bon endroit et au bon moment : cette activation spatio-temporelle de la réponse immunitaire est permise par le contrôle du trafic vésiculaire et concerne notamment la perception du pathogène et la mise en place des défenses (**Figure D-11**, Wang *et al.*, 2016a).

Lors de l'ETI, les récepteurs de types NB-LRR détectent généralement les effecteurs du pathogène dans plusieurs compartiments intracellulaires. De plus en plus de récepteurs NB-LRR ont été détectés à la fois dans le cytoplasme et le noyau. De récentes études suggèrent que les récepteurs NB-LRR activés interagiraient avec des messagers différents dans le noyau et le cytoplasme pour déclencher les défenses immunitaires. Chez l'orge (*Hordeum vulgare*), le récepteur NB-LRR MLA10 (intracellular mildew A, protéine réceptrice de l'effecteur Avr10) confère une résistance à l'oïdium (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, Bgh). Si cette protéine est exclue du noyau (en ajoutant un signal d'adressage NES (nuclear exporting signal) au niveau de la partie C-terminale de la protéine), la croissance de *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* n'est plus réduite mais la mort cellulaire est toujours présente. Au contraire, si MLA10 n'est localisée que dans le noyau (en ajoutant un signal d'adressage NLS (nuclear localization signal) au niveau de la partie C-terminale de la protéine), il n'y a plus de mort cellulaire mais la croissance de l'agent pathogène est réduite. La localisation nucléo-cytoplasmique de cette protéine est donc nécessaire à l'activation et à la coordination d'une réponse immunitaire normale à Bgh chez l'orge (Bai *et al.*, 2012). La nécessité d'une localisation nucléaire et cytoplasmique des protéines de type NB-LRR afin d'activer une réponse immunitaire normale a également été démontrée chez d'autres pathosystèmes tels que la protéine RPS4 d'*Arabidopsis thaliana* qui détecte AvrRPS4 de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 ou POPP2 de *R. solanacearum* (Gassmann *et al.*, 1999; Deslandes *et al.*, 2003; Narusaka *et al.*, 2009). Chez la pomme de terre (*Solanum tuberosum*), la résistance au virus X1 ne peut être activée que lorsque la protéine RX1 est cytoplasmique, mais afin d'obtenir une résistance

complète, elle doit aussi être présente au sein du noyau. La protéine RX1 ne possédant pas de signal NLS, les auteurs de cette étude ont fait l'hypothèse de l'existence d'une interaction entre une protéine chaperone ciblant le noyau et RX1 : en effet le domaine CC (coiled coil) de RX1 interagit notamment avec une protéine à activité GTPase (RanGAP2) jouant un rôle dans le trafic nucléo-cytoplasmique des protéines (Slootweg *et al.*, 2010). Néanmoins cette double localisation des protéines de résistance de type NB-LRRs n'est pas nécessaire à l'obtention d'une réponse immunitaire normale chez tous les pathosystèmes : par exemple, RPM1 est un récepteur toujours localisé dans la membrane plasmique d'*Arabidopsis thaliana* même lorsqu'il est activé par les effecteurs AvrRPM1 ou encore AvrB de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (Gao *et al.*, 2011).

Lors de la PTI, les PAMPs sont reconnus par des récepteurs PRRs (pattern recognition receptors). Lorsque ces récepteurs sont activés, ils subissent une endocytose et sont véhiculés dans la vacuole en passant par le réseau *trans*-Golgi (TGN : *trans*-Golgi network) puis par l'endosome tardif (LE : late endosome) pour former un corps multivésiculaire (MVB) (**Figure D-11**). Par exemple, chez *A. thaliana* la protéine FLS2 (Flagellin-Sensing 2), récepteur kinase qui détecte la flagelline bactérienne contenant le domaine conservé flg22 est chaperonnée par la protéine RABA6A (protéine RAB (Ras-related in brain) à activité GTPase). Ce marquage contribue à la livraison du complexe FLS2/RABA6A du TGN vers le LE. Dans le LE, les protéines RABF1 et RABF2B vont à leur tour chaperonner FLS2 et permettre l'exportation de FLS2 vers la vacuole où le complexe sera détruit. De nouveaux récepteurs seront ensuite synthétisés afin de détecter d'éventuelles nouvelles intrusions (Underwood, 2016).

Après perception du pathogène, la mise en place des défenses locales est permise notamment par une réorganisation du trafic cellulaire et par des modifications du cytosquelette. Par exemple, chez *Arabidopsis thaliana* plusieurs gènes ont été identifiés dans la résistance à la pénétration de l'oïdium (*Erysiphe cichoracearum* et *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) : *PEN1* et *PEN3* (PEN pour pénétration) (Collins *et al.*, 2003; Assaad, 2004; Kwon *et al.*, 2008). *PEN1* encode un récepteur SNARE (soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor) impliqué dans la fusion de membranes au niveau de la membrane plasmique. *PEN1* s'accumule au niveau de la paroi cellulaire du site de pénétration. *PEN3* est un transporteur localisé au niveau de la membrane plasmique. *PEN1* n'est pas néo-synthétisé lorsque les mécanismes de défenses immunitaires sont activés, cette protéine est relocalisée au niveau du site de pénétration. De plus, d'autres protéines liées au trafic vésiculaire sont impliquées dans la résistance à l'oïdium, par exemple la protéine KEG (Keep On Going) est indispensable à l'exportation des protéines de défense C14 et PR1. Les oïdiums adaptés à leur cellule hôte dégradent la protéine KEG. Ces données suggèrent ainsi que certains pathogènes auraient la capacité d'interagir avec le trafic vésiculaire de la plante hôte (Uemura *et al.*, 2012; Gu and Innes, 2012). De manière similaire à *PEN1*, *PEN3* n'est pas néo-synthétisé afin d'être accumulé au niveau du site de pénétration de l'hôte. De plus, cette accumulation est induite par la perception de PAMPs tels

que la flagelline ou encore la chitine, suggérant ainsi que les protéines PRRs pourraient convertir l'information spatiale de reconnaissance des pathogènes en recrutement local de protéines de défense (**Figure D-11**, Underwood and Somerville, 2013).

Etant donnée l'importance du changement de dynamique du trafic vésiculaire lors de la réponse immunitaire, il est logique que l'organisation du cytosquelette qui contribue aux mouvements vésiculaires joue également un rôle fondamental dans la PTI et l'ETI. En effet, par exemple les myosines XI associées à l'actine contribuent aux mouvements des organites et aux cycles d'endocytoses en réponse à la pénétration de *Bgh* (Yang *et al.*, 2014). De plus, *Arabidopsis* Actin-Depolymerizing Factor 4 (ADF4), protéine impliquée dans la rupture des filaments d'actine est nécessaire à l'ETI déclenchée par la perception de l'effecteur AvrPPHB de *Pseudomonas syringae* (Tian *et al.*, 2009). Néanmoins, ADF4 n'est pas requis afin de déclencher une ETI lors de l'interaction entre *Arabidopsis thaliana* et les effecteurs AvrB et AvrRPT2 de *Pseudomonas syringae* : chez le mutant n'exprimant pas ADF4, la réponse hypersensible est absente mais la multiplication de la bactérie est tout de même restreinte après perception des effecteurs (Porter *et al.*, 2012). Les protéines ADFs jouent également un rôle dans la résistance du blé (*Triticum aestivum*) à la rouille jaune (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*). Dans ce pathosystème, TaADF3 régule négativement la résistance à la pénétration par le champignon et TaADF7 régule positivement la production de radicaux libres et la réponse hypersensible des cellules (Fu *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2016). De plus, en présence de plusieurs PAMPs dont la flagelline et la chitine, la densité de filaments d'actine augmente (Henty-Ridilla *et al.*, 2013, 2014) et le comportement individuel de ces filaments est également modifié. En effet, la détection des PAMPs implique une inhibition de la protéine de coiffe de l'actine CP (capping protein, hétérodimère formée des sous-unités α et β) par l'acide phosphatidique (lipide impliqué dans des voies de signalisation). Pour finir, l'étude du mutant d'*Arabidopsis thaliana* *cpb-1* (capping protein sub-unit β) montre un réseau de filaments d'actine identique à celui des plantes traitées avec un PAMP, et les modifications de ce réseau d'actine contribuent à la sensibilité à *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 chez *Arabidopsis thaliana* (Li *et al.*, 2015b).

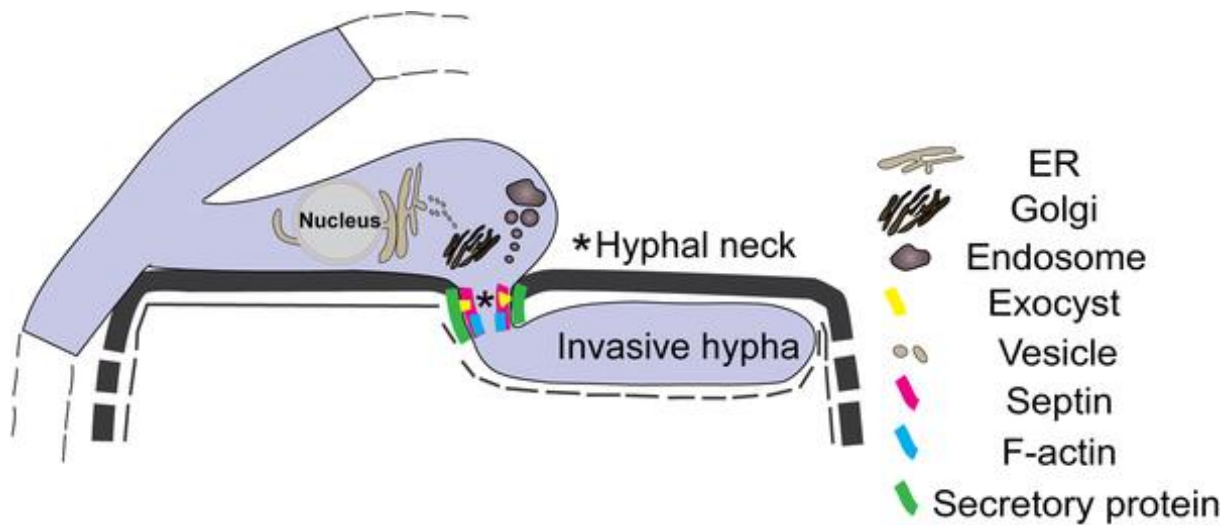


Figure D-12 : Schéma illustrant l'accumulation et la livraison de protéines de sécrétion au niveau du col de l'hyphe de *Verticilium dahliae* (extrait de Zhou *et al.*, 2017).

Un hypodermis pénètre à travers les parois cellulaires racinaires et l'hyphe invasif se développe. Le col de l'hyphe joignant l'hypodermis à l'hyphe invasif forme l'interface de pénétration champignon/hôte où de petites protéines de sécrétion sont accumulées et sécrétées. La septine (*VdSEP5*), l'actine-F ; les exocystes (*VdEXO70* et *VdSEC8*), la protéine *VdSEC22* liée au trafic entre le réticulum endoplasmique (ER) et l'appareil de Golgi et la protéine *VdSYN8* liée au trafic endosomal sont des protéines impliquées dans la livraison des protéines sécrétées au niveau de l'interface de pénétration.

b. Rôle des vésicules dans la pathogénicité de *Verticillium*

Une colonisation réussie par un agent pathogène passe par la suppression ou l'évitement des défenses immunitaires de son hôte et par l'acquisition réussie des nutriments nécessaires au développement de son cycle biologique. L'étude de différents pathosystèmes suggère que l'accomplissement de ces deux objectifs passe par la livraison de protéines, de petites molécules et de petits ARN effecteurs supprimant ou manipulant les processus cellulaires de l'hôte afin de les rendre bénéfiques au pathogène (Rovenich *et al.*, 2014; Lo Presti *et al.*, 2015). La formation de structures d'infection du pathogène requiert le recrutement fréquent de nouvelles membranes de l'hôte ou la formation d'interface spécifique impliquant une manipulation considérable du trafic membranaire de l'hôte et de son organisation cellulaire. Parmi les différents types de structures utilisées par les pathogènes, beaucoup de bactéries phytopathogènes manipulent leur hôte en utilisant des appareils de sécrétions de protéines tels que le système de sécrétion de type III (utilisé par *Ralstonia solanacearum* par exemple) (Büttner and He, 2009). Les pathogènes viraux manipulent des composants des membranes et du cytosquelette de la cellule hôte afin de favoriser leur prolifération et leur mouvement par les plasmodesmes (Heinlein, 2015). Les pathogènes filamenteux tels que *Verticillium* sp. peuvent orchestrer des manipulations complexes du trafic et de l'organisation cellulaire de l'hôte afin de former une interface d'infection (Underwood, 2016). Par exemple, pour infecter le coton (*Gossypium barbadense*), *Verticillium dahliae* V592 forme une structure spécialisée dans l'infection appelée hyphopodium qui développe un hyphe de pénétration (ou penetration peg, **Figure D-12**). Après pénétration, l'hyphopodium et l'hyphe sont séparés par le col de l'hyphe (ou hyphal neck) et forment ainsi l'interface hôte/champignon (Zhou *et al.*, 2017). Cette compartimentation n'est possible qu'avec la mise en place d'un anneau de septine VdSEP5 (protéine appartenant au cytosquelette du champignon). Une souche mutante de *Verticillium dahliae* V592 dans VdSEP5 réduit le taux de pénétration des protéines sécrétées au niveau de cette interface. Les mutants au niveau des protéines VdSEC22 et VdSYN8, deux protéines impliquées dans le trafic vésiculaire SNAREs (soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor) respectivement importantes dans la modulation du trafic du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi et dans l'endosome, réduisent la pathogénicité de ces souches chez le coton par rapport à la souche sauvage. Ceci met en évidence l'existence de multiples voies de sécrétion lors de l'infection des racines de coton par *Verticillium dahliae* (Zhou *et al.*, 2017). Chez le pathosystème *Gossypium barbadense* / *Verticillium dahliae*, les auteurs émettent l'hypothèse que les protéines sécrétées, bien que non identifiées, seraient des effecteurs. Ces effecteurs sont supposés porter une grande diversité de fonctions biologiques afin de créer un environnement favorable à la prolifération et à la reproduction du pathogène. Parmi les effecteurs déjà identifiés, ceux qui ont été les plus caractérisés sont impliqués dans le dérèglement du cytosquelette de l'hôte ou encore dans le trafic vésiculaire de l'hôte.

Par exemple, l'effecteur Avr1 de *Phytophthora infestans* a la capacité d'interagir avec la protéine SEC5 de la pomme de terre (*Solanum tuberosum*). Cette protéine est un des composants du complexe multiprotéique d'exocytose impliqué dans l'attache des vésicules (exocyste) avant leur fusion à leur membrane cible. L'extinction de l'expression du gène *SEC5* chez *Nicotiana benthamiana* interrompt la sécrétion de PR1 et diminue les dépôts de callose au niveau du site d'infection (Heider and Munson, 2012; Du *et al.*, 2015). *SEC5* est donc un nouvel exemple de gène impliqué dans la résistance à un pathogène et non dans sa sensibilité comme *MtSEC14*.

Les différents exemples ont permis d'illustrer l'importance du trafic vésiculaire dans la réponse immunitaire des plantes ainsi que dans la pathogénicité des micro-organismes. La protéine *MtSEC14* identifiée comme gène de sensibilité à *Verticillium alfalfae* chez *Medicago truncatula* possédant un domaine GOLD caractéristique des protéines liées au trafic vésiculaire, une interaction entre un éliciteur de *Verticillium alfalfae* V31-2 et la forme sensible de la protéine *MtSEC14* pourrait être à l'origine de la sensibilité de *Medicago truncatula*.

III. Identification d'un gène de sensibilité à *Verticillium alfalfae* chez *Medicago truncatula*

Le gène Medtr7g070480 codant pour une protéine SEC14 serait un gène de sensibilité à *Verticillium alfalfae* V31-2 chez *Medicago truncatula*. Les gènes de sensibilité (ou gènes S) sont caractérisés par leur capacité à faciliter l'infection et la réaction de compatibilité entre l'hôte et le pathogène (van Schie and Takken, 2014). Bien qu'identifié des décennies avant cela, le concept de gène de sensibilité a été défini en 2002 après l'identification du gène de résistance à l'oïdium (*Erysiphe cichoracearum*) *PMR6* (Powdery Mildew Resistance 6) chez *Arabidopsis thaliana* comme « une nouvelle forme de résistance à la maladie basée sur la perte d'un gène indispensable à une interaction compatible » (Eckardt, 2002; Vogel *et al.*, 2002). Des mutations ou des pertes de gènes S peuvent ainsi limiter la capacité du pathogène à causer une maladie chez l'hôte. Si les gènes de résistance R sont typiquement dominants, la résistance conférée par la perte ou la mutation d'un gène S est généralement récessive (Pavan *et al.*, 2010; van Schie and Takken, 2014). À ce jour, aucun gène de sensibilité impliqué dans une QDR chez les Légumineuses n'a été décrit.

1. Nature des gènes de sensibilité identifiés

En distinguant différentes phases caractéristiques de l'interaction hôte-pathogène, il existe trois différents mécanismes permettant aux gènes S de faciliter la sensibilité de l'hôte et de contribuer à l'installation de l'infection : les gènes facilitant la reconnaissance de l'hôte et la pénétration, les gènes encodant des régulateurs négatifs des voies de signalisation de l'immunité végétale, et les gènes contribuant à la survie du pathogène post-pénétration comblant les besoins structuraux et métaboliques du pathogène nécessaire à sa prolifération (van Schie and Takken, 2014).

a. Gènes facilitant la reconnaissance de l'hôte et la pénétration du pathogène

La cuticule et les cires la composant forment une première barrière aux pathogènes foliaires. Chez *Medicago truncatula*, le mutant *irg1* (inhibitor of rust germ tube differentiation 1) dont la quantité d'alcools primaires dans la cire est réduite présente une diminution du taux de germination de spores des pathogènes causant la rouille (*Phakopsora pachyrhizi* et *Puccinia emaculata*) et l'anthracnose (*Colletotrichum trifolii*) (Uppalapati *et al.*, 2012).

Le mutant *ram2* de *Medicago truncatula* (Required for Arbuscular Mycorrhization 2) dont la composition en cutine racinaire est altérée (le gène RAM2 encode une glycerol-3-phosphate acyl transferase), est plus résistant à *Phytophthora palmivora*. Néanmoins, il est intéressant de noter que ce mutant *ram2* est dans l'incapacité d'établir une symbiose mycorhizienne avec *Gigaspora rosea*. L'oomycète *Phytophthora palmivora* mime donc le processus de symbiose mycorhizienne afin d'infecter la plante (Wang *et al.*, 2012a).

Les stomates constituent une porte d'entrée pour les pathogènes bactériens foliaires afin d'accéder à l'apoplasme. La fermeture des stomates induite par les plantes constitue donc un important mécanisme de défense basale. Ainsi, par exemple le gène *LECRK* (Lectine Receptor Kinase) d'*Arabidopsis thaliana* est un régulateur négatif de la fermeture des stomates induite par les pathogènes. En effet, la perte de fonction de ce gène entraîne une résistance accrue d'*Arabidopsis thaliana* à *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (Desclos-Theveniau *et al.*, 2012).

Des gènes de sensibilité impliqués dans la dynamique membranaire nécessaire à l'établissement de structures d'infections telles que les hutoria ont également été identifiés. Le gène de sensibilité à l'oïdium *MLO* (Mildew Locus O) rentre dans cette catégorie. *MLO* encode une protéine membranaire, et son rôle dans la sensibilité à l'oïdium a été confirmé chez *Arabidopsis*, le pois (*Pisum sativum* L.), la tomate (*Solanum lycopersicum*), le piment (*Capsicum annuum*) le blé (*Triticum aestivum*) et la fraise (*Fragaria x ananassa*) (Humphry *et al.*, 2002; Consonni *et al.*, 2006; Bai *et al.*, 2008; Pavan *et al.*, 2011; Várallyay *et al.*, 2012; Zheng *et al.*, 2013; Jiwan *et al.*, 2013). *MLO* est nécessaire pour établir la sensibilité à des pathogènes compatibles et les mutants *mlo* présentent une perte de sensibilité ressemblant à une résistance non-hôte (Humphry *et al.*, 2006). Cette résistance est indépendante des hormones acide jasmonique, éthylène et acide salicylique mais nécessite la mise en place d'un trafic vésiculaire impliquant l'actine (Consonni *et al.*, 2006; Miklis *et al.*, 2007).

Chez l'orge, d'autres gènes de sensibilité à la pénétration de l'oïdium (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*) ont été identifiés : *HvRACB*, *HvRAC1*, *HvRAC3* et *HvROP6*. Ces gènes encodent de petites protéines RAC/ROP (Rho-GTPases / RHO-related proteins from plants), protéines intervenant dans les mouvements du cytosquelette et dans le trafic vésiculaire. En plus de son rôle dans la sensibilité à l'oïdium, *HvRAC1* confère également la résistance à la pénétration à *Magnaporthe oryzae* (Schultheiss *et al.*, 2002).

b. Gènes encodant des régulateurs négatifs des voies de signalisation de l'immunité végétale

Les régulateurs négatifs de l'immunité sont les gènes permettant la suppression de l'immunité en l'absence de pathogène. Néanmoins, lorsque le pathogène manipule ces gènes, ils peuvent être considérés comme des gènes de sensibilité (Pavan *et al.*, 2010; van Schie and Takken, 2014).

Certains gènes de sensibilité ont la capacité de réprimer la PTI/DTI (PAMP/DAMP triggered immunity). Ainsi, les celluloses synthases (CESAs) possèdent un rôle structural important en contribuant à la formation de la paroi cellulaire, une des premières barrières physiques à la pénétration des pathogènes. Les mutants dans le gène *CESA3* (*cev1*, constitutive expression of *VSP1* (gène encodant une protéine de stockage dont le promoteur est dépendant de l'acide jasmonique)) d'*Arabidopsis thaliana* présentent une plus grande résistance aux oïdiums (*Erysiphe cichoracearum*, *Erysiphe orontii*, *Oidium lycopersicum*) que les accessions sauvages. Ces mutants montrent également une expression constitutive des voies de défense de l'acide jasmonique et de l'éthylène ainsi qu'une taille réduite (Ellis and Turner, 2001; Ellis *et al.*, 2002). Les gènes *CESA4*, *CESA7* et *CESA8* sont aussi impliqués dans la sensibilité aux pathogènes *Ralstonia solanacearum*, *Plectosphaerella cucumerina*, *Botrytis cinerea* et *Erysiphe cichoracearum* (Hernández-Blanco *et al.*, 2007). Bien que les quantités réduites de cellulose puissent en partie expliquer cette résistance en défavorisant l'attachement et la pénétration des pathogènes, les auteurs de cette étude ont aussi émis l'hypothèse qu'une accumulation d'oligogalacturonides (précurseurs de la cellulose) chez les mutants *cesa* induirait une DTI. En effet, l'expression de plusieurs gènes de défense est induite chez les mutants *cesa4*, *cesa7* et *cesa8* bien que cette résistance soit indépendante de l'acide salicylique, de l'acide jasmonique et de l'éthylène (Hernández-Blanco *et al.*, 2007).

Certains gènes répresseurs de la voie de signalisation des MAPKs (MAP kinases, voie de signalisation sur laquelle repose la PTI) peuvent aussi être considérés comme des gènes de sensibilité. Cette voie de signalisation est notamment réprimée par des MAPKs phosphatases (MKPs). Ainsi, MKP1, MKP2 et dans une moindre mesure la protéine tyrosine phosphatase (PTP1) ciblent les protéines MPK3 et MPK6 afin de réprimer la PTI chez *Arabidopsis thaliana*. En conséquence, les mutants *mpk* sont moins sensibles à *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* et à *Ralstonia solanacearum* (Bartels *et al.*, 2009; Lumbreras *et al.*, 2010; Anderson *et al.*, 2011). Les protéines MPK4 du soja (*Glycine max*) et MAPK5 du riz (*Oryza sativa*) possèdent des rôles similaires de répression de la PTI ou des défenses induites par l'acide salicylique. Les mutants dans le gène *MPK4* montrent une réduction de la sensibilité à l'oomycète *Peronospora manshurica* et au virus de la mosaïque du soja (Liu *et al.*, 2011b). Les mutants dans le gène *MAPK5* ont une résistance accrue à la bactérie *Burkholderia glumae* et aux champignons *Magnaporthe oryzae* et *Magnaporthe grisea* (Xiong and Yang, 2003).

Les facteurs de transcription WRKY sont des substrats des MAPKs, ils interviennent dans la reprogrammation transcriptionnelle provoquée par la perception d'un pathogène. Ces facteurs de transcription peuvent fonctionner en tant que répresseurs ou activateurs de la PTI. Par exemple, le facteur de transcription *WRKY8* d'*Arabidopsis thaliana* est un gène de sensibilité à *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* et joue également un rôle dans la résistance de l'arabette au virus de la mosaïque du tabac (Chen *et al.*, 2010a, 2013). Les enzymes réprimant la DTI et les protéines de signalisation réprimant la PTI peuvent être impliquées dans la sensibilité à plusieurs types de pathogènes ou au contraire être très spécifiques.

c. Gènes contribuant à la survie du pathogène post-pénétration

Lorsqu'une interaction hôte pathogène est établie, les pathogènes continuent d'utiliser la machinerie cellulaire de l'hôte afin d'obtenir les métabolites nécessaires à leur réplication et à leur prolifération. Certains de ces pathogènes appuient largement le succès de leur interaction avec leurs hôtes sur des gènes de sensibilité. Par exemple, chez le riz (*Oryza sativa*), parmi les trente gènes de résistance à *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) identifiés, neuf sont des gènes récessifs dont l'allèle dominant confère la sensibilité à *Xoo* (Chu *et al.*, 2006a).

Des gènes de sensibilité ont été identifiés parmi les transporteurs de sucres. Par exemple, chez le riz, les gènes *XA13* et *XA25* encodant les protéines SWEET11 et SWEET13 sont impliqués dans la sensibilité à *Xoo*. Ces protéines sont des transporteurs membranaires de sucres nécessaires à la sensibilité à ce pathogène en exportant dans l'espace apoplastique des sucres servant de nutriments au pathogène. Chez *Arabidopsis*, les gènes *SWEET* sont surexprimés en présence des pathogènes *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Golovinomyces cichoracearum* et *Botrytis cinerea*. Les auteurs de cette étude ont émis l'hypothèse que ces gènes pouvaient jouer un rôle dans la sensibilité à ces pathogènes chez *Arabidopsis thaliana* (Chen *et al.*, 2010b).

En plus du transport, la production de métabolites peut aussi être augmentée afin de bénéficier au pathogène. Ainsi, chez l'orge (*Hordeum vulgare*) l'alcool déshydrogénase (ADH) est induit par l'infection par l'oïdium (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*) et participe à la croissance du pathogène en augmentant le métabolisme glycolytique anaérobie. Les mutants knock-out dans le gène *ADH* sont moins sensibles à l'oïdium (Pathuri *et al.*, 2011).

Un dernier exemple de gène de sensibilité contribuant à la survie du pathogène dans la cellule hôte concerne la réplication des virus. Ces derniers possèdent des génomes très compacts et ils se reposent largement sur la machinerie de la cellule hôte et notamment sur les mécanismes de réplication et de traduction afin de compléter leur cycle de vie. Par exemple, les protéines TOM1, TOM2, et TOM3 (tobamovirus multiplication 1, 2 et 3) sont des protéines transmembranaires du tonoplaste

d'*Arabidopsis thaliana* nécessaires à la formation du complexe de réplication de l'ARN des tobamovirus tels que le virus de la mosaïque de la tomate ou le virus de la mosaïque du tabac (Yamanaka *et al.*, 2000; Tsujimoto *et al.*, 2003). Ces protéines sont partiellement redondantes, et l'extinction simultanée des gènes *TOM1* et *TOM3* conduit à l'inhibition de la réplication du virus (Yamanaka *et al.*, 2002). De plus, l'extinction de l'expression des homologues des gènes *TOM* chez *Nicotiana tabacum* et *Nicotiana benthamiana* provoque une inhibition efficace de la multiplication du virus de la mosaïque du tabac mais pas celle du virus de la mosaïque du concombre (un bromovirus). Le rôle des protéines TOM dans la sensibilité aux virus est donc très conservé chez les espèces végétales et spécifiques aux tobamovirus (Asano *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2007).

2. Evolution et conséquences écologiques et agronomiques d'un gène de sensibilité

a. Rôle pleiotropique des gènes de sensibilité

L'existence de gènes de sensibilité aux pathogènes nous amène à nous interroger sur les raisons pour lesquelles les plantes conservent ces gènes au cours du temps étant donné qu'une infection par un pathogène réduit la fitness de la plante. L'étude de différents mutants knock-out dans ces gènes de sensibilité a mis en évidence une pléiotropie de phénotypes observés : au cours de l'évolution les plantes ont donc pu conserver les gènes de sensibilité lorsque le gain de fitness résultant de la contribution des gènes de sensibilité surpassait la perte de fitness engendrée par le pathogène (van Schie and Takken, 2014). Cette pléiotropie phénotypique existe pour les trois classes de gènes de sensibilité précédemment définie : les gènes impliqués dans la reconnaissance de l'hôte et la pénétration du pathogène, les régulateurs négatifs des défenses immunitaires et les gènes favorisant la survie du pathogène au sein de la cellule hôte.

Un exemple du rôle fondamental de gènes de sensibilité chez *Medicago truncatula* est relié aux symbioses mycorhiziennes et rhizobiennes. Ainsi, le mutant *ram2* est plus résistant à l'oomycète *Phytophthora palmivora* mais il est incapable d'établir une symbiose mycorhizienne avec *Gigaspora rosea* (Wang *et al.*, 2012a). Un autre exemple concerne le facteur de transcription NF-Y (nuclear factor Y), complexe composé de trois sous-unités NF-YA, NF-YB et NF-YC (Xiao *et al.*, 2013) nécessaire au développement des nodules chez *Medicago truncatula* (Combier *et al.*, 2006). Le mutant *mtnf-ya1-1* est plus résistant à l'oomycète *Aphanomyces euteiches* mais en conséquence, il ne peut plus établir de symbiose rhizobienne avec *Sinorhizobium meliloti* (Rey *et al.*, 2016). Ces deux exemples illustrent comment deux espèces d'oomycètes ont évolué afin de mimer certaines caractéristiques des bactéries et champignons symbiotiques pour assurer le succès de leur pénétration au sein des racines de *Medicago truncatula*. La symbiose permettant aux légumineuses d'assimiler des nutriments non biodisponibles sans ces micro-organismes, la conservation de ces gènes de sensibilité chez *Medicago truncatula* peut s'expliquer par le bénéfice apporté par *Sinorhizobium meliloti* et *Gigaspora rosea*.

La pléiotropie du gène *MLO* (gène impliqué dans la sensibilité à l'oïdium) a été étudiée chez plusieurs plantes hôtes. Par exemple, le mutant *mlo7* d'*Arabidopsis thaliana* présente de plus petits poils absorbants et des problèmes de croissance des tubes polliniques alors que le mutant *mlo* de l'orge n'établit plus de symbiose mycorhizienne avec *Glomus mosseae* (Ruiz-Lozano *et al.*, 1999; Kessler *et al.*, 2010). Néanmoins, la fonction de certains gènes de la famille *MLO* a considérablement divergé chez certaines espèces où les mutants *mlo* présentent une résistance accrue à l'oïdium sans effets indésirables observables chez la tomate, le pois et la fraise (Bai *et al.*, 2008; Pavan *et al.*, 2008, 2011; Humphry *et al.*, 2011; Jiwan *et al.*, 2013). D'un point de vue agronomique, les problèmes de pléiotropie observés peuvent être surmontés en introgressant le gène de sensibilité

muté dans un fond génétique favorable : les mutants *mlo* sont utilisés avec succès en agriculture (Michael F. Lyngkjær *et al.*, 2000).

Les effets les plus sévères de la suppression de gènes de sensibilité impliqués comme régulateurs négatifs des défenses de l'hôte concernent les gènes participants directement ou indirectement dans la suppression des voies de défense impliquant l'acide salicylique. Les mutants dans ces gènes où la PTI et ETI sont constitutivement activées présentent des phénotypes délétères tels qu'une nanification et l'apparition de lésions spontanées provoquées par des radicaux libres et des réponses hypersensibles (Lorrain, 2003; Moeder and Yoshioka, 2008). De plus, de par l'activité antagoniste de l'acide salicylique sur l'acide jasmonique, les plantes deviennent généralement sensibles aux pathogènes nécrotrophes dont les résistances sont souvent dépendantes des voies de l'acide jasmonique (Robert-Seilanianantz *et al.*, 2011). Ainsi, chez *Arabidopsis thaliana*, les mutants dans les gènes MKP4 présentent une résistance accrue à *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* et à *Hyaloperonospora arabidopsidis* (mildiou), mais ils sont sensibles aux champignons nécrotrophes tel qu'*Alternaria brassicicola*, atteints de nanisme et souffrent de lésions nécrotiques (Petersen *et al.*, 2000; Andreasson *et al.*, 2005; Brodersen *et al.*, 2006; Berriri *et al.*, 2012; Colcombet *et al.*, 2013). Les mutants dans le facteur de transcription WRKY8 sont plus résistants à *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* mais sont sensibles aux infections virales comme le virus de la mosaïque du tabac, au sel et à *Botrytis cinerea* (Chen *et al.*, 2010a, 2013; Hu *et al.*, 2013).

Les gènes de sensibilité favorisant la survie du pathogène au sein de l'hôte ont eux aussi des rôles importants au sein du métabolisme végétal et même si leur mutation confère une résistance à certains pathogènes, la perte de ces gènes a des conséquences plus néfastes pour les plantes. Par exemple, chez le riz (*Oryza sativa*), le double mutant *sweet14/11* est bien résistant à *Xoo*, mais les plantes sont plus petites et souffrent d'un avortement pollinique (Chu *et al.*, 2006b; Antony *et al.*, 2010). Quant au double mutant *sweet11/12* d'*Arabidopsis thaliana*, une réduction de la taille de l'appareil racinaire et un retard de croissance des parties aériennes sont observés (Chen *et al.*, 2012). Dans ces cas, les sucres nécessaires à la croissance des pathogènes ne sont plus présents dans l'apoplasme, mais ils ne sont pas non plus exportés vers les cellules qui en ont besoin.

b. Durabilité des résistances liées à l'altération de gènes de sensibilité

D'un point de vue agronomique, la potentielle durabilité des résistances apportées par les gènes de sensibilité mutés est un aspect des plus intéressants dans le cadre de programmes de sélection. Cette durabilité plus importante des gènes de sensibilité par rapport aux gènes de résistance peut s'expliquer par la capacité d'un pathogène par une unique mutation d'un effecteur, d'un PAMP ou d'un DAMP à

éviter sa reconnaissance par les récepteurs codés par les gènes de résistance de la cellule hôte. Dans ce cas, la durabilité de la résistance peut être prédite en estimant le potentiel évolutif du pathogène ainsi que le coût de la perte de l'effecteur pour le pathogène en terme de fitness (Lo Presti *et al.*, 2015). De plus, la durabilité de la résistance dépend également du fond génétique de l'hôte : s'il possède déjà des QTLs de résistance au pathogène, cette résistance peut être plus stable. Cela a déjà été montré chez le piment (*Capsicum annuum*) dans la résistance quantitative aux nématodes du genre *Meloidogyne* et chez le colza (*Brassica napus*) dans la résistance quantitative à la nécrose du collet (*Leptosphaeria maculans*) (Brun *et al.*, 2010; St.Clair, 2010; Barbary *et al.*, 2014).

En revanche, pour détourner une résistance basée sur la mutation d'un gène de sensibilité, le pathogène doit surmonter la dépendance au facteur de son hôte. Le pathogène peut ainsi avoir besoin d'acquérir une nouvelle fonction, ce qui est plus difficile que la perte de fonction (par exemple une modification d'un effecteur reconnu par son hôte). La survie des pathogènes biotrophes obligatoires tel que *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (oidium) repose sur différents facteurs de la plante hôte dont les métabolites nécessaires à leur reproduction (Spanu *et al.*, 2010). C'est la raison pour laquelle les résistances basées sur la mutation de gènes de sensibilité sont prédites plus durables. Par exemple, le gène *MLO* (Mildew Locus O) de l'orge (*Hordeum vulgare*) conférant une résistance à toutes les races d'oïdium (*Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*) identifiées au champ est toujours efficace soixante-dix ans après sa découverte (Freisleben and Lein, 1942; Jørgensen, 1992; Michael F. Lyngkjær *et al.*, 2000). Un second exemple de durabilité d'un gène de sensibilité muté concerne la résistance du piment (*Capsicum annuum*) aux potyvirus (comme le virus de Y de la pomme de terre) conférée par *eIF4E* (plant eukaryotic translation initiation factor 4E). Cette résistance a maintenant été détournée, mais elle a été efficace pendant plus de cinquante ans (Moury *et al.*, 2014).

c. Considérations concernant *MtSEC14*, facteur de sensibilité à la verticilliose chez *Medicago truncatula*

Sans plus de connaissances sur la localisation intracellulaire de *MtSEC14* (Medtr7g070480) ainsi que sur d'éventuels partenaires d'interaction, il n'est pas possible à ce jour d'identifier avec certitude la nature de ce gène de sensibilité à *Verticillium alfalfae* (gène facilitant la reconnaissance de l'hôte et la pénétration du pathogène, gène encodant des régulateurs négatifs des voies de signalisation de l'immunité végétale, ou gène contribuant à la survie du pathogène post-pénétration). Néanmoins, d'après l'étude microscopique réalisée avec la souche GFP de *Va* V31-2, il ne semblerait pas que ce gène de sensibilité facilite la pénétration et la colonisation du pathogène. En effet, aucune différence de colonisation n'est observable entre 2 et 24 heures après inoculation chez l'accession résistante A17

et l'accession sensible F83005.5 : les spores germent et les hyphes colonisent les vaisseaux du xylème. En revanche, entre 4 et 7 jours après inoculation, les racines de l'accession A17 ne présentent plus de trace du pathogène alors que chez l'accession F83005.5, les hyphes ont complètement colonisé les racines (Toueni *et al.*, 2016). On pourrait donc faire l'hypothèse que ce gène serait soit un régulateur négatif des défenses immunitaires de *Medicago truncatula*, soit un gène contribuant à la survie du pathogène au sein de la plante.

D'après la littérature les gènes de sensibilité impliqués dans les résistances qualitatives seraient tous dominants (toutes les résistances par mutation ou perte de gènes S sont récessives). Il est difficile de faire des hypothèses sur le caractère de dominance ou de récessivité du gène *MtSEC14* étant donné qu'aucun autre gène de sensibilité impliqué dans une QDR n'a été décrit. A l'heure actuelle, nous ne pouvons pas affirmer avec certitude le caractère dominant du gène de sensibilité, de nouvelles données sur la réponse à *Va* V31-2 des populations de HIFs hétérozygotes au niveau du gène *MtSEC14* doivent être acquises et comparées à celles de RILs fixés pour ce gène.

Une éventuelle pléiotropie du gène *MtSEC14* n'a pas encore été testée. Néanmoins, lors de la multiplication en serre de la lignée NF17607 en génération R1, les plantes ont montré une taille réduite, un nombre de gousses et de graines plus faible que les plantes sauvages (plantes multipliées dans des conditions strictement identiques). Une comparaison de la fitness des wild type seebings et des homozygotes mutants dans le gène *MtSEC14* est donc à envisager afin de savoir si l'extinction de ce gène de sensibilité chez une espèce cultivée telle que la luzerne pourrait lui permettre de conserver ses traits agronomiques d'intérêt.

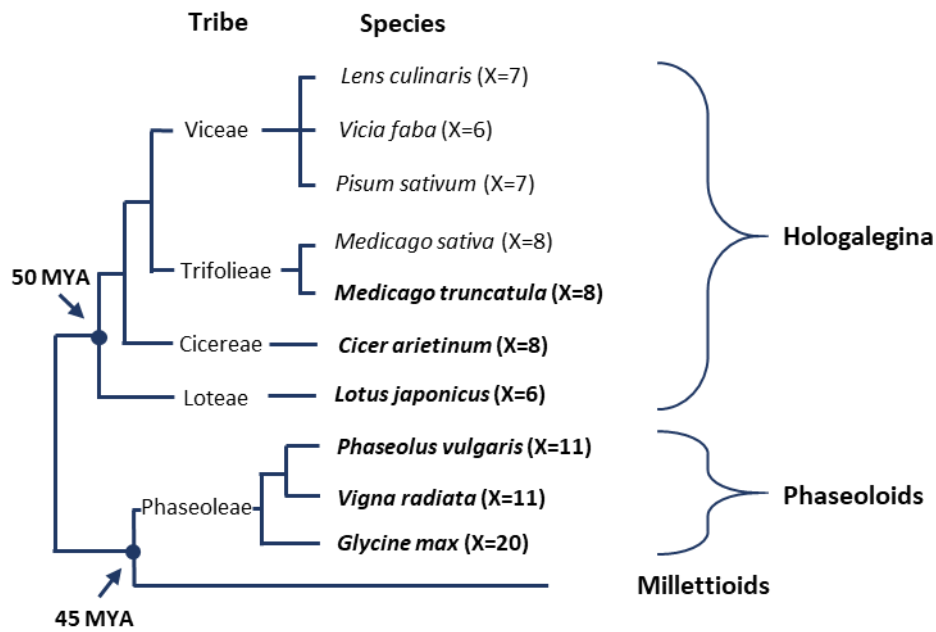


Figure D-13 : Relations taxonomiques entre dix espèces de légumineuses (reproduit à partir de Lee *et al.*, 2017).

Ces espèces sont réparties dans cinq tribus à l'intérieur de deux clades distinctes les hologalegina et les phaséoloïdes. Parmi ces espèces, les six espèces dont le génome a été assemblé sont en gras. Le X représente le nombre de chromosome de chacune de ces espèces. A l'exception de *Medicago sativa* (tétraploïde), l'ensemble de ces espèces sont diploïdes.

MYA : million years ago.

IV. Applications des résultats obtenus aux espèces de légumineuses cultivées

Les analyses réalisées au cours de cette thèse ont permis l'identification de QTLs de résistance à *Verticillium alfalfae* chez *Medicago truncatula* ainsi que la validation fonctionnelle du gène de sensibilité *MtSEC14*. Même si les intérêts agronomiques et économiques de *Medicago truncatula* sont restreints (la luzerne tronquée n'est cultivée qu'en Australie), sa synténie avec d'autres espèces de légumineuses cultivées peut permettre de transposer les résultats obtenus aux espèces cultivées. La **Figure D-13** illustre la proximité taxonomique entre dix espèces de légumineuses (*Medicago truncatula*, *Medicago sativa*, *Glycine max* (soja), *Lotus japonicus* (lotier), *Pisum sativum* (pois), *Vicia faba* (fève), *Lens culinaris* (lentille), *Cicer arietinum* (pois chiche), *Vigna radiata* (haricot mungo), *Phaseolus vulgaris* (haricot)). Ces dix espèces sont réparties en deux clades, les hologalegina et les phaséoloïdes ayant émergé il y a respectivement 50 et 45 millions d'années. *Medicago truncatula* et *Medicago sativa* appartiennent au clade des hologalegina et à la tribu des *Trifolieae*. Comme le montre la **Figure D-14**, ces deux espèces présentent également une synténie importante : seul un réarrangement chromosomique (translocation inversée) de la partie terminale des chromosomes 4 et 8 est observable (Lee *et al.*, 2017).

Malgré la complexité du génome de *Medicago sativa* (tétraploïdie), deux études de génétique d'association ont été menées et ont permis de mettre en évidence différents QTLs de résistance à *Verticillium alfalfae*. Une première étude réalisée sur treize populations artificielles a mis en évidence dix-sept marqueurs SNPs liés à la résistance à *Verticillium alfalfae* localisés sur les chromosomes 1, 2, 4, 7 et 8 (Zhang *et al.*, 2014). La seconde étude réalisée sur 179 variétés élités de luzerne a permis d'identifier de nouveaux QTLs sur les chromosomes 5, 6, 7 et 8 (Yu *et al.*, 2016). La présence de ces différents QTLs s'explique par l'origine des populations utilisées pour effectuer les analyses : d'origines naturelles ou issues de croisements artificiels, elles ne possèdent pas toutes les mêmes sources de résistance. L'introgression par croisement de ces différents QTLs dans un unique fond génétique est une stratégie pouvant permettre d'obtenir des variétés de luzerne plus résistantes. En effet, les QTLs ont généralement des effets additifs, toutefois il existe des exceptions telles que la QDR de la laitue (*Lactuca saligna*) contre le mildiou (*Bremia lactucae*) : seuls trois combinaisons de deux QTLs sur dix testées permettent d'augmenter le niveau de résistance (den Boer *et al.*, 2014).

Les auteurs de ces études suggèrent une colocalisation des QTLs de résistance identifiés chez la luzerne cultivée avec ceux précédemment identifiés chez *Medicago truncatula* par l'analyse des populations de RILs (Ben *et al.*, 2013a). En ce qui concerne le chromosome 7, Yu *et al.* ont identifié un facteur de transcription de la famille GRAS de type PAT1 comme gène candidat à la résistance à la verticilliose sans indiquer le nom de ce gène orthologue chez *Medicago truncatula*. D'après mes recherches, l'unique gène encodant un facteur de transcription de la famille GRAS (famille comptant 63 membres chez *Medicago truncatula*) de type PAT1 et colocalisant avec les QTL de résistance identifiés à partir

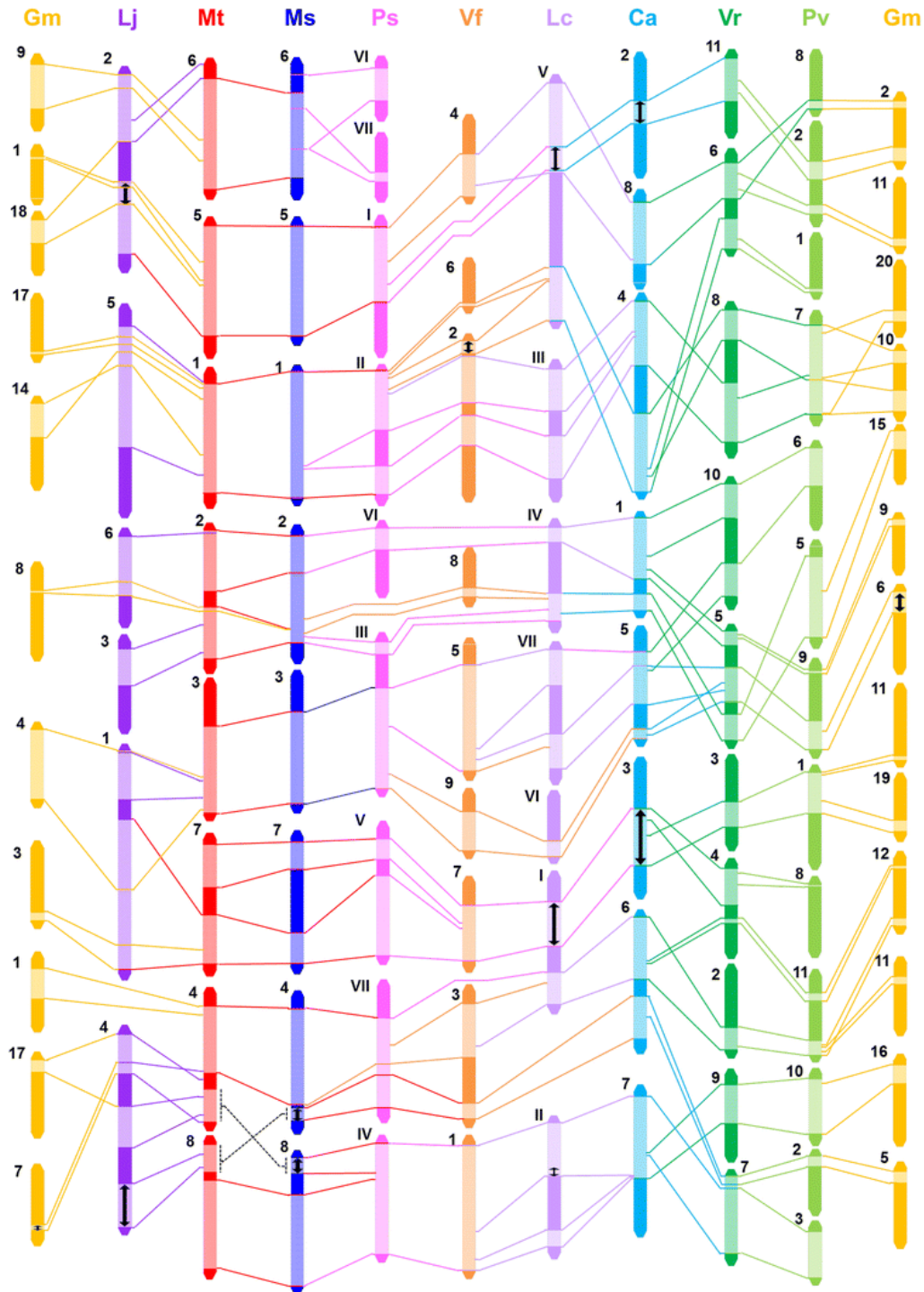


Figure D-14 : Relations macrosynténiques simplifiées entre dix espèces de légumineuses (extrait de Lee *et al.*, 2017).

Les groupes de liaison/chromosomes et les blocs synténiques de chaque espèce sont à l'échelle au sein de chaque espèce mais pas entre espèces. Les lignes symbolisent les réarrangements des groupes de liaisons/chromosomes prédits, les flèches doubles représentent les inversions de groupe de liaisons.

Mt, *Medicago truncatula*; *Ms*, *Medicago sativa*; *Gm*, *Glycine max*, *Lj*, *Lotus japonicus*. *Ps*, *Pisum sativum*; *Vf*, *Vicia faba*; *Lc*, *Lens culinaris*; *Ca*, *Cicer arietinum*; *Vr*, *Vigna radiata*; *Pv*, *Phaseolus vulgaris*.

des populations de RILs est Medtr7g057230. Ce dernier est situé entre les nucléotides 20 530 626 et 20 532 599 et ne colocalise pas avec les pics du chromosome 7 identifiés par l'analyse de génétique d'association menée dans le cadre de cette thèse dont le pic principal se situe entre les nucléotides 25 995 000 et 26 025 000 et le pic secondaire entre les nucléotides 20 040 000 et 20 060 000. Les auteurs de cette étude ont donc potentiellement identifié une autre source de résistance à *Verticillium alfalfae* sur le chromosome 7 ou ils ont identifié le mauvais candidat du fait d'une trop faible densité de marqueurs dans leur analyse. En effet, l'étude a été réalisée en utilisant un total de 19 801 SNPs sur un génome dont la taille est estimée à 800 Mb. Parmi ces SNPs, 12 938 ont été alignés sur le génome de *Medicago truncatula* v4.0. Soixante-sept SNPs se trouvent entre les positions 25 000 000 et 27 000 000 (soit en moyenne 1 SNP/30 000 bp) et cinquante-neuf entre les positions 20 000 000 et 21 000 000 (soit environ 1 SNP/17 000 bp) du chromosome 7 de *Medicago truncatula*, zones génomiques correspondant respectivement aux pics principal et secondaire de notre analyse GWAS. De plus, parmi les autres gènes candidats à la résistance à la verticilliose localisés sur les chromosomes 6 et 8 ainsi que sur des fragments génomiques non ancrés, aucun n'est un homologue de *MtSEC14* (Medtr7g070480) alors qu'il existe un homologue à *MtSEC14* chez *Medicago sativa* CADL mais non cartographié sur le génome de la luzerne cultivée *Medicago sativa* (contig non ancré). Pour finir, pour l'instant, aucune validation fonctionnelle n'a été effectuée sur les gènes candidats à la verticilliose chez la luzerne.

Pour transposer les résultats obtenus chez la légumineuse modèle *Medicago truncatula* aux légumineuses cultivées, une stratégie de sélection assistée par marqueurs (SAM) peut être envisagée. Le développement de ces marqueurs peut être réalisé en utilisant la méthode de la BSA (Bulk Segregant Analysis). Elle consiste à regrouper plusieurs individus au phénotype identique, puis à les génotyper en utilisant des marqueurs connus. Les marqueurs favorables ou non au phénotype d'intérêt peuvent alors être identifiés en les associant avec les différents phénotypes observés. Pour la transposition des résultats de *Medicago truncatula* vers *Medicago sativa*, les marqueurs d'intérêt doivent se trouver dans la séquence codante du gène d'intérêt ou dans ses régions flanquantes. Les marqueurs peuvent aussi être développés en séquençant la région d'intérêt dans plusieurs génotypes. Le séquençage de gène candidat a déjà été utilisé avec succès afin de développer des marqueurs liés à la floraison et à la taille de la luzerne cultivée. En effet, un gène *CONSTANS-LIKE* a d'abord été identifié chez *Medicago truncatula*, puis des marqueurs ont été développés à partir du séquençage de 400 génotypes issus de dix cultivars. Trois SNPs se sont avérés très significativement associés à la floraison et à la hauteur chez la luzerne cultivée (Herrmann *et al.*, 2010). La méthode BSA a été utilisée pour développer des marqueurs associés à la résistance à l'anthracnose (*Colletotrichum trifolii*) à partir du gène *RCT1* identifié chez *Medicago truncatula*. Cependant, cette analyse n'a pas permis d'identifier de marqueurs associés à la résistance à l'anthracnose chez *Medicago sativa*. Les auteurs de cette étude

ont émis l'hypothèse que le gène *RCT1* ne conférait pas cette résistance chez la luzerne cultivée (Julier *et al.*, 2013).

Si la législation en vigueur le permet, des variétés transgéniques de luzerne résistantes à *Verticillium alfalfae* V31-2 peuvent être générées en utilisant des gènes décrits chez *Medicago truncatula*, à condition que l'effet du gène introduit par transgénèse sur la résistance soit fort tel que *MtSEC14*. Cette stratégie a déjà été utilisée avec succès afin de transférer le gène de résistance aux trois races de *Colletotrichum trifolii* (agent pathogène responsable de l'anthracnose) *RCT1* de *Medicago truncatula* à *Medicago sativa* (Yang *et al.*, 2008). Le transfert de gène de résistance des espèces modèles aux espèces cultivées a également été réalisé chez d'autres genres. Par exemple le transfert du récepteur kinase *NbFLS2* de *Nicotiana benthamiana* à l'oranger (*Citrus sinensis*) permet de réduire la sensibilité à *Xanthomonas citri* responsable du chancre des agrumes (Hao *et al.*, 2016). Le récepteur protéique RLP23 d'*Arabidopsis thaliana* transféré à la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) lui confère une meilleure résistance aux oomycètes et aux champignons tels que *Phytophthora infestans* et *Sclerotinia sclerotiorum* (Albert *et al.*, 2015).

De plus, dans le cas du gène de sensibilité *MtSEC14*, l'utilisation de nouvelles technologies comme l'édition de génome par le système CRISPR/Cas9 est également envisageable afin d'éteindre l'expression de ce gène (Michno *et al.*, 2015; Curtin *et al.*, 2017; Meng *et al.*, 2017). Cette technique ayant été utilisée avec succès chez *Medicago truncatula*, elle pourrait être testée chez *Medicago sativa*. En effet, la ploïdie de la luzerne n'est pas forcément un problème dans un tel système, la spécificité de CRISPR/Cas9 permet de modifier des homéoallèles. Par exemple, les trois homéoallèles encodant la protéine MLO de résistance à l'oïdium ont pu être modifiés chez le blé hexaploïde (Wang *et al.*, 2014b). En revanche, comme décrit précédemment la modification de ces allèles peut provoquer une pléiotropie.

E. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La lutte contre les pathogènes racinaires tel que *Verticillium alfalfae* de par leur localisation dans le sol ou dans les plantes passe par l'amélioration génétique des espèces à intérêts agronomiques. Ces espèces ont généralement des génomes complexes comme par exemple *Medicago sativa* (génome tétraploïde, plante allogame). Ainsi, afin d'élucider une partie des mécanismes génétiques impliqués dans la résistance à la verticilliose, une des plantes modèles des légumineuses *Medicago truncatula* (génome diploïde, plante autogame) a été utilisée dans cette étude. Grâce aux progrès technologiques, à la baisse des coûts de séquençage et au projet collaboratif *Medicago truncatula* Hapmap, plus de 37 millions de SNPs ont été identifiés sur un total de 384 accessions naturelles de *Medicago* sp. Cette densité de marqueurs génétiques a permis de réaliser une étude de génétique d'association sur 246 accessions de *M. truncatula* dont la réponse à l'inoculation par *Verticillium alfalfae* V31-2 a été étudiée afin d'identifier des gènes candidats à la résistance. Cette étude, complémentaire des approches d'études QTLs réalisées sur des populations biparentales de *Medicago truncatula* (Ben *et al.*, 2013a) et de l'étude transcriptomique réalisée chez les génotypes A17 (résistant à Va V31-2) et F83005.5 (sensible à Va V31-2) en réponse à l'inoculation par *Verticillium alfalfae* (Toueni *et al.*, 2016), est à l'origine de la découverte de nouveaux QTLs de résistance à V31-2 et de la confirmation de la présence de QTLs sur le chromosome 7 des populations LR4 (A17xDZA315.16) et LR5 (A17xF83005.5). Ces nouveaux QTLs sont dépendants des phénotypes de maladie utilisés lors de l'étude de génétique d'association, suggérant notamment des contrôles génétiques différents de progression de la maladie et de la colonisation des parties aériennes par *Verticillium alfalfae* V31-2.

Une étude de génétique d'association a également été réalisée sur la réponse à Va V31-2 au sein de la population tunisienne Soliman de *Medicago truncatula* où la majorité des accessions sont sensibles à Va V31-2. De nouveaux gènes candidats non détectés par l'analyse de GWAS réalisée sur la biodiversité au sein de l'espèce *Medicago truncatula* ont ainsi été détectés : ceci permet de confirmer le caractère quantitatif et polygénique de la résistance à la verticilliose chez *Medicago truncatula*. De plus, cette étude intra-population permet également de mettre en évidence des gènes candidats moins représentés au sein de la biodiversité naturelle de l'espèce.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la validation fonctionnelle des gènes candidats à cette résistance Medtr7g070440 (codant pour une protéine F-BOX) et Medtr7g070480 (codant pour une protéine SEC14), identifiés grâce à l'analyse de GWAS au sein de la biodiversité de l'espèce *Medicago truncatula* et situés sur le chromosome 7, lieu de convergence des différentes études génétiques. Différentes approches ont été envisagées afin de valider le rôle de nos candidats dans la réponse à Va V31-2 aussi bien chez *Medicago truncatula* que chez d'autres espèces végétales telles que *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana benthamiana* et *Lotus japonicus*. Chez *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana* sp. et *Lotus* sp., des homologues de nos candidats ont été recherchés et des études de pathogénicité ont été réalisées. Il s'est avéré que *Nicotiana tabacum* n'était pas un hôte de Va V31-2,

les symptômes chez *Arabidopsis thaliana* Col-0 étaient très limités. *Nicotiana benthamina* est très sensible à *Va* V31-2 et *Lotus japonicus* présente également des symptômes de flétrissement. Ainsi, des lignées mutantes *LORE1* de *Lotus japonicus* Gifu dans le gène Lj1g3v2391210, homologue du gène Medtr7g070480 codant pour la protéine SEC14 ont été autofécondées et les génotypes des descendants ont été obtenus. Néanmoins, Gifu étant un génotype résistant à *Va* V31-2, et si Lj1g3v2391210 code également un gène de sensibilité à la verticilliose, la validation fonctionnelle de ce gène dans la réponse à *Va* V31-2 par des mutants d'insertion pourra s'avérer difficile.

Chez *Medicago truncatula*, des mutants d'insertion *Tnt1* dans nos gènes candidats ont été recherchés. Seules deux lignées mutantes dans le gène Medtr7g070480 codant pour la protéine SEC14 ont été identifiées fin 2016. Ces lignées ont été autofécondées l'hiver dernier et leur caractérisation génétique ainsi que leur réponse à *Va* V31-2 sont en cours. De plus, le fond génétique R108 dont sont issues les lignées mutantes *Tnt1* est sensible à *Va* V31-2, l'observation de phénotype plus résistant à *Va* V31-2 serait donc possible. Etant donnée la non disponibilité de mutants d'insertion dans nos gènes candidats lors du début de l'étape de validation fonctionnelle, une transformation génétique racinaire de *Medicago truncatula* a été effectuée et deux systèmes de culture ont ensuite été utilisés : des plantes chimériques aux racines transformées cultivées sur sable et perlite, et des racines transgéniques cultivées *in vitro*. Au sein de ces plantes, l'expression des gènes candidats a été réduite en utilisant des amiRs ciblant ces gènes candidats. Le gène Medtr7g070480 a également été surexprimé en utilisant la séquence codante de ce gène de l'accession A17 résistante à *Va* V31-2. Aucun résultat significatif de l'effet de la surexpression ou de la sous-expression du gène candidat n'a pu être obtenu en utilisant les plantes chimériques aux racines transformées. Néanmoins, la mise en place d'un système original d'inoculation *in vitro* sur racines transgéniques a mis en évidence le rôle du gène Medtr7g070480 codant pour une protéine SEC14 dans la résistance à *Verticillium alfalfae* chez *Medicago truncatula*. L'extinction de ce gène chez les génotypes A17 et F83005.5 diminue la colonisation des racines transgéniques par *Va* V31-2 alors que sa surexpression augmente la colonisation chez A17 : il s'agirait d'un gène de sensibilité. La nature de ce gène de sensibilité ne peut pas être déterminée avec certitude même si l'hypothèse d'un gène de sensibilité facilitant la pénétration et la colonisation du pathogène semble peut probable puisqu'aucune différence de colonisation racinaire par une souche GFP de *Va* V31-2 n'est observable entre 2 et 24 heures après inoculation chez l'accession résistante A17 et l'accession sensible F83005.5 (Toueni *et al.*, 2016). Ce gène serait donc plutôt un gène contribuant à la survie du pathogène au sein de la plante ou un régulateur négatif des défenses immunitaires de *Medicago truncatula*. De plus, l'implication du trafic vésiculaire dans la résistance à *Va* V31-2 chez *Medicago truncatula* est suggérée par la présence d'un domaine GOLD chez la protéine SEC14 encodée par le gène Medtr7g070480.

Pour poursuivre la caractérisation des mécanismes de résistance à *Verticillium alfalfae* chez *Medicago truncatula*, plusieurs angles sont envisageables.

I. Quelles sont les caractéristiques fonctionnelles et la localisation intracellulaire de la protéine SEC14 ?

Les protéines de la famille des SEC14 sont caractérisées par leur capacité de transfert des phospholipides (phosphatidylinositol et/ou phosphatidylcholine) à travers les membranes chez la levure. Chez cette famille protéique, la quasi-totalité des protéines ont la capacité de reconnaître les phosphatidylinositols, mais pas les phosphatidylcholines. Des hypothèses sur la reconnaissance d'autres lipides par les protéines SEC14 ont été émises, néanmoins cela n'a pas encore été montré chez les plantes (Schaaf *et al.*, 2011). Des tests biochimiques chez la levure exprimant le gène *MtSEC14* pourraient permettre de confirmer la capacité de transfert des phospholipides de la protéine tel que déjà réalisé pour la validation fonctionnelle d'autres membres de la famille des protéines SEC14 chez les plantes (Kiba *et al.*, 2014). Pour cela, il faudrait cloner l'intégralité de la séquence codante du gène Medtr7g070480 de l'accession A17 dans un vecteur d'expression de levure tel que YEplac195PGK, puis transformer une souche de levure comme CTY1-1A. L'activité de transfert des phospholipides pourra ensuite être quantifiée après incubation de cultures liquides de levures en présence de phospholipides radiomarqués, extraction des phospholipides par la méthode d'Atkinson et autoradiographie (Lopez *et al.*, 1994; Kiba *et al.*, 2012).

Outre la fonctionnalité générale de transfert de lipides, le rôle du résidu 423 de la protéine SEC14 pourrait être également analysé. En effet, le résidu 423 de cette protéine chez l'accession A17 résistante à *Va* V31-2 est une sérine alors qu'il s'agit d'une asparagine chez F83005.5. L'acide aminé sérine a la caractéristique de pouvoir être phosphorylé par des protéines kinases contrairement à l'asparagine. Même si les outils de prédiction en ligne tel que PlantPhos (Lee *et al.*, 2011) ne prédisent aucune phosphorylation au niveau de la sérine 423, une analyse des sites de phosphorylation de cette protéine est envisageable. Pour cela, un extrait purifié de cette protéine intacte est nécessaire. Cela peut être réalisé en créant une protéine recombinante possédant un marqueur épitope (petite séquence constituée de 8 à 11 acides aminés reconnus par des anticorps) puis en transformant et en exprimant cette protéine chez la levure. Ensuite, l'extrait protéique est purifié en utilisant l'anticorps reconnaissant la protéine recombinante. Une fois la protéine intacte obtenue, un enrichissement en phosphopeptide est nécessaire afin de détecter l'ensemble des sites de phosphorylation de cette protéine. Cet enrichissement peut être réalisé en utilisant des billes de dioxyde de titane (TiO₂). Ces billes ont une haute affinité pour les phosphopeptides et enrichissent de façon très efficace les

protéines (Gundry *et al.*, 2009). Après digestion de la protéine par une protéase, l'identification de modifications post-transcriptionnelles telles que les phosphorylations est ensuite effectuée grâce à la séparation des peptides par une chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à de la spectrométrie de masse MS/MS (détection de la masse et de la charge des peptides) : la phosphorylation d'un résidu entraîne une augmentation de 80 Da du peptide (Jensen, 2006).

La localisation intracellulaire de la protéine SEC14 pourrait également nous renseigner sur son rôle au sein de la cellule et des voies de défenses des plantes : est-elle cytoplasmique et interagit-elle avec d'autres protéines ou est-elle plutôt nucléaire et intervient-elle au niveau de l'expression des gènes ? Deux techniques sont envisageables afin de localiser cette protéine. La première est l'immunolocalisation des protéines grâce à des anticorps spécifiques. La protéine native n'étant pas modifiée, cette technique permet de la localiser précisément. Néanmoins, cela implique l'utilisation d'un anticorps spécifique et montrant une grande affinité à cette protéine. Cette technique a déjà été utilisée avec succès chez *Medicago truncatula* (Hause *et al.*, 2006). La seconde technique qui pourrait être utilisée serait la création d'une protéine recombinante fluorescente. Pour cela la séquence fluorescente d'une protéine telle que la GFP est fusionnée à l'ADNc codant la protéine SEC14 puis insérée dans un vecteur avant transformation génétique des plantes. Les protéines peuvent ensuite être visualisées par microscopie. Deux inconvénients majeurs à cette technique s'appliquent à notre cas d'étude : la présence de la séquence fluorescente peut modifier la localisation intra-cellulaire de la protéine et les domaines fonctionnels de la protéine peuvent être inactivés par la présence de cette séquence (Snapp, 2005).

Tableau E-1 : Phénotype de réponse à l'inoculation par différents pathogènes racinaires des accessions A17 et F83005.5.

Pathogène	Phénotype de réponse à <i>Medicago truncatula</i>	
	A17	F83005.5
<i>Verticillium alfalfae</i> V31-2 ^a	Résistante	Sensible
<i>Verticillium dahliae</i> JR2 ^b	Sensible	Résistante
<i>Verticillium non-alfalfae</i> LPP0323 ^b	Sensible	Résistante
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>medicaginis</i> 179.29 ^c	Sensible	Résistante
<i>Rasltonia solanacearum</i> GMI 1000 ^d	Sensible	Résistante
<i>Rasltonia solanacearum</i> UW377 ^d	Résistante	Sensible

^a(Ben *et al.*, 2013a), ^b(Negahi *et al.*, 2013), ^c(Ramírez-Suero *et al.*, 2010) et ^d(Vailleau *et al.*, 2007)

II. Le gène *MtSEC14* confère-t-il une sensibilité à large spectre chez *Medicago truncatula* ?

Cette question revient à essayer de déterminer si ce gène appartient plutôt à la voie de l'ETI ou de la PTI. La PTI se caractérise plutôt par une résistance à large spectre de pathogènes. Nous disposons au laboratoire de plusieurs espèces de *Verticillium* telles que *Verticillium dahliae* JR2 ou encore *Verticillium non-alfalfae* LPP0323 ainsi que des souches d'autres pathogènes racinaires telles que *Fusarium oxysporum* f.sp. *medicaginis* 179.29, ou encore *Rasltonia solanacearum* GMI 1000 et UW377. *Medicago truncatula* est un hôte de ces pathogènes et les accessions A17 et F83005.5 présentent une réponse contrastée à ces pathogènes (**Tableau E-1**). L'étude de la réponse à ces pathogènes chez des plantes dont l'expression du gène *SEC14* est éteinte ou surexprimée pourrait nous renseigner sur cet aspect.

Cette étude pourrait être réalisée dans un premier temps sur des hairy roots. Nous disposons toujours au laboratoire des différentes cultures de hairy roots issues des fonds génétiques A17 et F83005.5 ayant permis la validation fonctionnelle de Medtr7g070480 dans la résistance à *Va* V31-2. Seule une mise au point du protocole d'inoculation serait éventuellement nécessaire pour *Fusarium oxysporum* f.sp. *medicaginis* et *Rasltonia solanacearum*. Cette première étude permettrait d'effectuer un crible des pathogènes et souches pour lesquels le gène *MtSEC14* serait impliqué dans la réponse immunitaire chez *Medicago truncatula*. Dans un second temps, la réponse des mutants *Tnt1* dans le gène *MtSEC14* aux pathogènes et souches sélectionnées pourraient ensuite être évaluée afin de confirmer *in vivo* les résultats obtenus sur hairy roots.

III. Le gène *MtSEC14* peut-il être une source de sensibilité chez *Medicago sativa* ?

Les premières analyses réalisées chez la luzerne cultivée au niveau diploïde (CADL, HM342) ont montré la présence d'un orthologue à Medtr7g070480, gène codant pour une protéine SEC14 chez *Medicago sativa*. En théorie, si le rôle de ce gène dans la résistance de *Medicago sativa* à la verticilliose est validé, des marqueurs moléculaires (SNPs) au sein des orthologues de *MtSEC14* pourraient donc être développés afin de faciliter la sélection de variétés de luzerne résistantes à la verticilliose. Néanmoins, avant le développement de ces marqueurs, une possible pléiotropie du gène *MtSEC14* doit être vérifiée. Pour cela, des essais de fitness et de production de biomasse aérienne peuvent être conduits en comparant les homozygotes mutants et les wild-type siblings de la lignée mutante NF17607 de *Medicago truncatula* possédant une insertion du transposon *Tnt1* dans le gène d'intérêt. En effet, pour être utilisé dans des variétés commerciales de luzerne, le gain de résistance à la verticilliose apporté par ce gène ne doit pas se faire aux dépens de traits d'intérêt agronomique et économique tels que la production de biomasse. Si la mutation du gène de sensibilité Medtr7g070480 a des effets néfastes sur ces traits, son insertion dans différents fonds génétiques plus favorables peut être envisageable. Cette stratégie a été utilisée chez l'orge (*Hordeum vulgare*) avec succès dans le cadre de la résistance à l'oïdium (*Erysiphe graminis* sp. *hordei*), où les mutants dans le gène de sensibilité *mlo* (mildew locus O) présentaient des tâches nécrotiques foliaires. Ce gène a donc été introgressé dans différents fonds génétiques pour identifier les plus favorables, afin d'obtenir des variétés d'orge résistantes à l'oïdium et sans nécroses (Michael F. Lyngkjær *et al.*, 2000).

Pour identifier de possibles marqueurs SNPs utilisables en sélection variétale, la réponse à *Verticillium alfalfae* d'un panel de variétés de luzerne sélectionnées pour leur diversité génétique doit être évaluée et le séquençage des orthologues de *MtSEC14* doit être réalisé. Pour identifier les orthologues de Medtr7g070480 codant pour une protéine SEC14 chez d'autres variétés de luzerne, des amorces PCR peuvent être déterminées en utilisant comme génome de référence CADL et plus précisément la séquence génétique du gène MSAD_291189 et ses régions flanquantes. L'association des résultats du phénotypage et des polymorphismes des orthologues de MSAD_291189 permettrait alors de déterminer les SNPs pouvant être utilisés comme marqueurs de sélection. Les gènes issus des différents génotypes peuvent être séquencés individuellement (Herrmann *et al.*, 2010) ou réunis pour conduire une analyse BSA (Bulk Segregant Analysis) (Castonguay *et al.*, 2010; Julier *et al.*, 2013). En ce qui concerne les collections de luzerne, le site Genesys (<https://www.genesys-pgr.org>, portail regroupant des informations sur les ressources génétiques végétales agricoles et alimentaires) répertorie en février 2018 un total de 20 278 variétés de *Medicago sativa*, il devrait donc être possible de constituer un panel d'accessions présentant une diversité génétique importante. À titre d'exemple, la collection de la SARDI (South Australian Research and Development Institute) compte 3 627 variétés provenant des cinq continents.

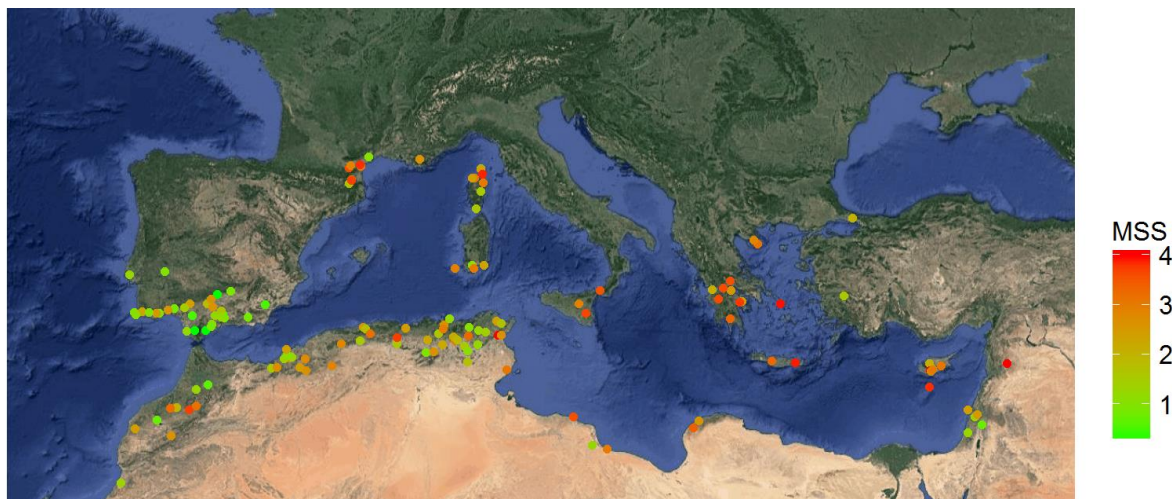


Figure E-1 : Répartition géographique des 211 accessions de *Medicago truncatula* dont l'origine est documentée et dont la réponse à *Verticillium alfalfae* V31-2 a été évaluée.

Chaque accession est représentée par un point dont la couleur varie en fonction du MSS corrigé après inoculation par *Va* V31-2.

IV. La résistance à *Verticillium alfalfae* V31-2 chez *Medicago truncatula* est-elle le fruit d'une adaptation locale ?

La **Figure E-1** est une carte représentant la répartition géographique des accessions de *Medicago truncatula* dont la réponse à *Va* V31-2 a été évaluée et dont l'origine géographique est connue en fonction du MSS. On peut remarquer que les accessions les plus résistantes à *Va* V31-2 sont situées à l'Ouest du bassin Méditerranéen alors que les plus sensibles sont à l'Est de ce bassin. Parmi les 35 accessions dont la longitude d'origine du lieu de prospection est supérieure à 16,5°E (soit à l'Est de la ville de Bari au Sud-Est de l'Italie), une unique accession est résistante (MSS < 2,5 et taux de réisolement < 20%) sur un total de 37 accessions résistantes représentées sur la carte. La souche *Va* V31-2 de *Verticillium alfalfae* a été isolée en Haute-Garonne (Molinéro-Demilly *et al.*, 2006), à l'Ouest du bassin Méditerranéen mais la présence du pathogène a été rapportée dans l'ensemble du bassin Méditerranéen. Ainsi, on peut se demander si le patron de distribution de la tolérance de *Medicago truncatula* à cette souche dans le bassin Méditerranéen signe une adaptation à cette contrainte. Il serait donc intéressant d'effectuer une étude de génétique d'association pour identifier des gènes de résistance chez *Medicago truncatula* à une souche de *Verticillium alfalfae* provenant de l'Est du bassin Méditerranéen pour comparer les réponses phénotypiques de la maladie au sein de l'espèce, les QTLs et les gènes candidats à la résistance. Un isolat de *Verticillium* provenant d'une culture de luzerne d'Iran a été isolé par Amir Fatash, étudiant en thèse au sein de notre laboratoire (thèse encadrée par le professeur Martina Rickauer). Des études de pathogénicité de cette souche vis-à-vis de différentes accessions de *Medicago truncatula* et sa caractérisation moléculaire pour déterminer l'espèce fongique sont en cours. Si la réponse à cette souche des lignées de *Medicago truncatula* est différente de celle de *Va* V31-2, une telle étude serait envisageable.

L'adaptation locale à la résistance à la verticilliose chez *Medicago truncatula* peut être testée à l'échelle de la population tunisienne Soliman. En effet, des prospections ont été réalisées au printemps 2017 par notre équipe en collaboration avec le docteur Naceur Djébali (Laboratoire des Substances Bioactives, Centre de Biotechnologie de Borj Cédria, Tunisie) en Tunisie afin d'isoler des souches de *Verticillium alfalfae* tunisiennes (Programme PHC Utique). Ces prospections ont notamment été réalisées dans la région de Soliman et les souches fongiques réisolées à partir de légumineuses spontanées montrant des symptômes de flétrissement sont en cours de caractérisation. Une évaluation de la pathogénicité d'une telle souche sur la population de *Medicago truncatula* de la région de Soliman suivie d'une étude de génétique d'association pourrait être comparée à celle déjà réalisée avec la souche *Va* V31-2. De plus, les plantes constituant la population de Soliman ont été sélectionnées en fonction du niveau d'électro-conductivité de leur sol de prospection, donc l'interaction stress biotique (*Verticillium alfalfae*) et stress abiotique (stress salin) pourrait également faire l'objet d'une autre étude.

V. Qu'en est-il des autres gènes candidats à la résistance à *Verticillium alfalfae* V31-2 chez *Medicago truncatula* ?

Les études de génétique d'association réalisées dans le cadre de ces travaux ont permis de mettre en évidence de nombreux gènes candidats. Parmi ces gènes, le gène Medtr1g101310 codant pour une protéine inactive rhomboid-like ou encore le gène Medtr1g042160.1 codant pour une protéine MATH paraissent de bons candidats à la résistance à *Verticillium alfalfae* V31-2 chez *Medicago truncatula*. En effet, ces deux gènes sont exprimés dans un pool de racines transgéniques d'A17 à 4, 8 et 24 heures après inoculation par *Va* V31-2. De plus, le gène Medtr1g101310 codant pour une protéine inactive rhomboid-like colocalise avec un précédent QTL de résistance à *Verticillium non-alfalfae* LPP0323 et pour finir, leur rôle dans la résistance aux pathogènes chez *Medicago truncatula* n'a pas encore été décrit. Une lignée mutante *Tnt1* chez *Medicago truncatula* dans le gène Medtr1g101310 est disponible (lignée NF3788-2). Le protocole de validation utilisant la culture de racines transgéniques et leur inoculation *in vitro* par *Verticillium alfalfae* V31-2 étant au point, il est envisageable de réaliser une validation fonctionnelle de ces gènes dans ces conditions. Néanmoins, au vu des difficultés rencontrées pour l'obtention de résultats probants avec le gène Medtr7g070480, détecté par des SNPs plus significatifs que pour les gènes Medtr1g101310 et Medtr1g042160 (pour le phénotype AUDPC, 5,94 pour Medtr7g070480, 5,35 pour Medtr1g101310 et 5,34 pour Medtr1g042160.1) lors de l'étude de génétique d'association réalisée sur la biodiversité naturelle de la réponse à *Va* V31-2 chez l'espèce *Medicago truncatula*, une modification de l'expression du gène Medtr7g070480 de façon simultanée avec celle des nouveaux gènes candidats serait à envisager.

VI. Conclusion

Au cours de cette thèse, nous avons identifié des gènes candidats à la résistance quantitative à *Verticillium alfalfae* V31-2 chez *Medicago truncatula*, en utilisant des études de génétique d'association. Cette résistance est singulière car elle s'exprime dans les racines de la plante, contrairement aux résistances à *Verticillium* sp. décrites chez d'autres plantes.

Peu de gènes impliqués dans des QDR ont été clonés à ce jour, et leurs fonctions sont diverses. Il existe donc un réel intérêt scientifique pour la connaissance de la fonction d'un nouveau gène impliqué dans une QDR. Chez les Légumineuses, cet intérêt scientifique se double d'un intérêt agronomique et écologique. La validation fonctionnelle du gène candidat Medtr7g070480 codant une protéine SEC14 a montré que ce gène est un facteur de sensibilité à *Verticillium alfalfae*. A notre connaissance, c'est la première description d'un gène de sensibilité impliqué dans une résistance quantitative à un micro-organisme chez les Légumineuses. Même si le rôle des mouvements vésiculaires dans la réponse immunitaire des plantes aux pathogènes est connu, l'implication dans une QDR d'un gène potentiellement impliqué dans le trafic vésiculaire n'avait pas encore été décrite.

Un gène orthologue à Medtr7g070480 a été identifié chez *Medicago sativa* CADL. Ces travaux pourront être transposables à la luzerne cultivée, pour laquelle la verticilliose peut provoquer des pertes de rendement atteignant 80%.

F.ANNEXES

Tableau F-1 : Caractéristiques des QTLs contre *Verticillium* sp. décrits chez *Medicago truncatula*.

A. Characteristics for the quantitative trait loci of resistance to *Verticillium alfalfae* V31-2 detected in LR3, LR4, and LR5 recombinant inbred line populations [R] and [S] indicate resistant and susceptible parental lines, respectively. h^2 , broad sense heritability; (H), narrow sense heritability; LOD, logarithm of odd score; QTL, quantitative trait locus (Ben *et al.*, 2013a).

B. Characteristics of quantitative trait loci (QTLs) for resistance to *Verticillium non alfalfae* LPP0323 detected in *Medicago truncatula* recombinant inbred lines (RILs) from a cross between lines A17 and F83005.5 (Negahi *et al.*, 2014)

A

Cross	Trait	Trait heritability h^2 (H)	Chromosome	Nearest marker	Peak LOD score	Peak (cM)	1-LOD support interval (cM)	QTL effect	Percentage of phenotypic variance	Percentage of additive variance
LR3: F83005.5 [S] × DZA45.5 [R]	Percentage of dead plants	0.32 (0.19)	2	EM4.250	6.0	196	193–197	−0.095	22.0	36
			6	mtic343	3.6	142	133–154	−0.067	18	
LR4: A17 [R] × DZA315.16 [S]	Maximum disease index	0.33 (0.20)	7	mtic432	11.1	60	55–70	0.41	32.2	92
	AUDPC	0.31 (0.18)	7	mtic273	12.3	58	55–70	0.0022	32.9	83
	Percentage of dead plants	0.46 (0.29)	7	mtic82	5.7	76	65–78	0.0907	20.6	32
LR5: A17 [R] × F83005.5 [S]	Maximum disease index	0.32 (0.19)	7	MTE85	22.6	58	54–61	0.5093	39.4	99
	AUDPC	0.32 (0.19)	7	MTE85	26.1	58	54–61	0.0028	42.5	99
	Percentage of dead plants	0.65 (0.48)	7	MTE85	14.9	65	56–68	0.1973	29.3	48

B

Trait	QTL	Linkage group	Nearest marker ^a	Position (cM) ^b	Peak LOD score	1-LOD confidence interval (cM)	Additive effect	R ² (%) ^c	TR ² (%) ^d	Rg ² (%) ^e	TRg ² (%) ^f
MSS	VwrMSS-1	LG1	mtic61	115	15.17	110–117.7	−0.285	20.95	39.23	23	43.3
	VwrMSS-2	LG2	MTE14	45	3.35	40–50	−0.126	4.16		4.5	
	VwrMSS-6	LG6	MTE39	0	4.36	0–10	−0.154	6.41		6.7	
	VwrMSS-8	LG8	mtic1194	105	4.27	100.5–109.8	−0.178	7.71		9	
AUDPC	VwrAUDPC-1	LG1	mtic61	115	14.81	110–117.7	−3.103	18.56	36.08	21.5	39.4
	VwrAUDPC-6	LG6	mtic662	5	4.81	0–14.4	−2.050	7.19		9.4	
	VwrAUDPC-8	LG8	mtic1194	105	4.11	100.5–109.8	−1.958	6.97		8.5	

^a SSR markers.

^b From the north of linkage group (LG).

^c Individual phenotypic variance explained by QTL.

^d Phenotypic variance explained by the QTL given all the covariants, computed using the *fitqtl* function of the *rqtl* package.

^e Individual genetic variance explained by QTL, computed using the *fitqtl* function of the *rqtl* package.

^f Total variance explained by the QTL.

F. ANNEXES

Tableau F-2 : Accessions et nombre de plantes utilisées par accession par répétition pour l'analyse GWAS.

Sur 13 expériences d'évaluation de la réponse à *Va* V31-2, six ont été effectuées par mes soins. L'entreprise RAGT R2N (Collaboration : M. C. Gras et M. C. Tardin) et des stagiaires à EcoLab sont à l'origine des autres expériences. Ce tableau récapitule également les différentes identifications des accessions et leur origine.

CC : core collection, RV : Répétition véritable, D : Damas, T : tunisienne. Le chiffre après RV correspond au numéro de la répétition biologique. Une lettre succède au numéro de la répétition biologique lorsque différentes expériences ont été nécessaires à l'obtention de l'ensemble des données. Les variétés « check » sont en gras.

* : Etudiants stagiaires au laboratoire

ID Hapmap	Name	ID Core Collection	Origin	Ecolab students*		R2N	Samy Benameur*				Mélanie Mazurier						Plant number	Number of replicates
				CC96 RV1A	CC96 RV1B	CC96 RV2 R2N	CC96 RV3	CC192 RV1C	CC192 RV2A	CC192 RV2B	CC192 RV3A	CC192 RV3B	D&T RV1	D&T RV2	D&T RV3A	T RV3B		
HM001	SA022322	L000163	Syria	7		10	10										27	3
HM002	SA028064	L000174	Cyprus	6		6	6										18	3
HM003	ESP 105-L	L000544	Spain	5		9	6										20	3
HM004	DZA45.6	L000736	Algeria	6		9	6	1		1	3	5	6	3	10	10	60	11
HM005	DZA315.16	L000734	Algeria	8	7	9	7	6		1	3	7	4	5	10	6	73	12
HM006	F83005.5	L000530	France		4	10	7	10		8	7	7	10	7	9	10	89	11
HM007	SALSES 71B	L000651	France	3		9	8										20	3
HM008	DZA 012-J	L000368	Algeria	7		10	9										26	3
HM009	GRC 020-B	L000555	Greece	8		10	5										23	3
HM010	SA024714	L000154	Italy	6		6	10										22	3
HM011	DZA 327-7	L000543	Algeria	7		9	4										20	3
HM012	SA026063	L000239	Morocco	8		10	8										26	3
HM013	SALSES 42B	L000648	France	7		9											16	2
HM014	DZA 233-4	L000542	Algeria	8		9	3										20	3
HM015	F 11013-3	L000550	France	2		10	9										21	3
HM016	SA009707	L000049	Tunisia			10	4	6									20	3
HM017		A10	Cultivar									7		9	7		23	3
HM018		A20	Cultivar									6		9		5	20	3
HM020	TN1.11	TN1.11	Tunisia									8	6	11		10	35	4
HM021	TN1.21	TN1.21	Tunisia									10	10	8		10	38	4
HM022	TN3.23	TN3.23	Tunisia										7	11	8		26	3
HM023	TN6.18	TN6.18	Tunisia									8	6	9			23	3
HM024	TN8.3	TN8.3	Tunisia									10	10	10		10	40	4
HM025	TN9.22	TN9.22	Tunisia									10	1	11			22	3
HM026	F 11008-C	L000450	France		6	7	7										20	3
HM027	F83005-9	L000531	France					10	6		7						23	3
HM028	DZA241-2	L000342	Algeria					9	7		9						25	3
HM031	ESP 158-A	L000545	Spain	5		7	6										18	3

F. ANNEXES

HM032	F 11005-E	L000549	France	8		10	8									26	3
HM033	F 20047-A	L000552	France	8		9	7									24	3
HM034	F 20089-B	L000554	France	5		4	7									16	3
HM035	F 66017	L000679	France	8		7	5									20	3
HM036	GRC 042-1	L000337	Greece			8	9	3								20	3
HM037	GRC 064-B	L000557	Greece	7		10	9									26	3
HM038	PRT 180-A	L000369	Portugal	8		8	8									24	3
HM039	SA003116	L000263	Israel	8		10	7									25	3
HM040	SA003780	L000321	Italy	5		10	9									24	3
HM041	SA009048	L000198	Libya	8		5	7									20	3
HM042	SA009119	L000290	Turkey	6		10	10									26	3
HM043	SA009944	L000310	Tunisia	8		4	5									17	3
HM044	SA014161	L000245	Jordan	8		10	6									24	3
HM045	SA014163	L000144	Jordan	6		4	4									14	3
HM046	SA027882	L000213	Morocco	7		7	7									21	3
HM047	DZA 014	L000654	Algeria			6	6	7								19	3
HM048	DZA 016-F	L000475	Algeria			10	10	7								27	3
HM049	DZA 058-5	L000360	Algeria		7	9	8									24	3
HM050	DZA 058-J	L000477	Algeria		3	10	10									23	3
HM051	DZA 202-4	L000357	Algeria		8	10	5									23	3
HM052	DZA 210-3	L000639	Algeria		7	8	9									24	3
HM053	DZA 246-6	L000601	Algeria		9	8	9									26	3
HM054	DZA 309-A	L000395	Algeria		7	10	7									24	3
HM055	DZA 326	L000675	Algeria		3	8	7									18	3
HM056	ESP 074-A	L000416	Spain		8	10	7									25	3
HM057	ESP 155-D	L000512	Spain			7	3	3								13	3
HM058	ESP 163-E	L000513	Spain		9	10	4									23	3
HM059	F 11012-A	L000449	France		2	2	7									11	3
HM060	F 20015-10	L000520	France		7	10	9									26	3
HM061	GRC 033-B2	L000645	Greece		7	6	9									22	3
HM062	GRC 063-D	L000379	Greece		7	8	4									19	3
HM063	PRT 176-F	L000525	Portugal		8	3	7									18	3
HM064	PRT 178-D	L000371	Portugal		5	6	6									17	3
HM065	PRT 179-J	L000370	Portugal		8	10	9									27	3
HM066	SA001489	L000204	Israel		9	10	6									25	3
HM067	SA001526	L000265	Algeria		8	9	4									21	3
HM068	SA003648	L000274	Portugal		8	8	3									19	3
HM069	SA007749	L000276	Tunisia		7	10	10									27	3
HM070	SA008625	L000307	Morocco		8	10	6									24	3
HM071	SA008626	L000297	Morocco		8	10	8									26	3

F. ANNEXES

HM072	SA009357	L000061	Algeria		5	10	6									21	3	
HM073	SA009710	L000052	Tunisia		3	10	6									19	3	
HM074	SA009866	L000314	Algeria		5	9	5									19	3	
HM075	SA012451	L000130	Italy		8	10	10									28	3	
HM076	SA023859	L000234	Tunisia			9	8	5								22	3	
HM077	SA027062	L000232	Greece		9	8	6									23	3	
HM078	SA027063	L000228	Greece		8	10	6									24	3	
HM079	DZA 045-4-C	L000362	Algeria		5	9	8									22	3	
HM080	DZA 061-B3d	L000637	Algeria		1	8	4									13	3	
HM081	DZA 202-5	L000356	Algeria		9	10	5									24	3	
HM082	DZA 210-2	L000355	Algeria		6	9	6									21	3	
HM083	DZA 210-5	L000354	Algeria		8	10	10									28	3	
HM084	DZA 243-6	L000394	Algeria		8	10	8									26	3	
HM085	DZA 319	L000673	Algeria		8	8	8									24	3	
HM086	DZA 322	L000674	Algeria			10	9	7								26	3	
HM087	DZA 323-1	L000397	Algeria		8	6	7									21	3	
HM088	DZA 323-D	L000497	Algeria			9	6	6								21	3	
HM089	ESP 155-A	L000431	Spain		8	6	5									19	3	
HM090	ESP 163-A	L000437	Spain		6	9	7									22	3	
HM091	ESP 171-F	L000548	Spain		9	9	9									27	3	
HM092	ESP 174-A	L000443	Spain		6	10	8									24	3	
HM093	ESP 173-A	L000444	Spain		7	9	7									23	3	
HM094	F 13006-1	L000574	France			8	7	5								20	3	
HM095	F 20025-4	L000458	France		9	10	8		10							37	4	
HM096	F 20026-F	L000460	France		7	10	8									25	3	
HM097	F 83005-G	L000522	France		7	6	6									19	3	
HM098	PRT 176-12	L000523	Portugal		7	4	7									18	3	
HM099	SA002840	L000202	Cyprus		7	4	8									19	3	
HM101	A17	L000738	Cultivar	6	9	10	8	9		9	10	8	9	6	9	10	103	12
HM103	SA004087	L000302	Tunisia		9	10	8									27	3	
HM104	SA008604	L000303	Algeria			10	6	5								21	3	
HM105	SA009137	L000293	Algeria		9	9	9									27	3	
HM106	SA009434	L000060	Tunisia		9	10	4									23	3	
HM107	SA009670	L000047	Algeria		8	10	8									26	3	
HM108	SA009715	L000317	Tunisia		9	10	7									26	3	
HM109	SA011959	L000126	Israel		8	8	8									24	3	
HM110	SA021560	L000225	Libya		5	10	8									23	3	
HM111	SA027192	L000219	Italy		5	10	7									22	3	
HM112	SA028097	L000178	Cyprus		7	10	5									22	3	
HM113	CRE007-J	L000537	Greece, Crete					2	5		4					11	3	

F. ANNEXES

HM114	CRE009-A	L000338	Greece, Crete					2	6		1	6					15	4
HM115	Cyprus_C	L000529	Cyprus					6	5		5						16	3
HM116	DZA211	L000659	Algeria					6	9		6						21	3
HM117	ESP031-A	L000401	Spain					6	7		6						19	3
HM118	ESP043-B	L000410	Spain					9	8		8						25	3
HM119	ESP050-B	L000414	Spain					4	2		6						12	3
HM120	ESP095-C	L000482	Spain					3	9		8						20	3
HM121	ESP104-A	L000430	Spain					1	1		5						7	3
HM122	Esp159-11	L000546	Spain					3	3			3					9	3
HM123	ESP163-B	L000440	Spain					5	9		10						24	3
HM124	Esp165-D	L000547	Spain					9	9		9						27	3
HM125	ESP175-A	L000445	Spain					1		1		2					4	3
HM126	F20015-L	L000456	France, Corsica					7	7		8						22	3
HM127	F20025-F	L000455	France, Corsica					6	8		4						18	3
HM128	F20058-6	L000620	France, Corsica					7	8		7						22	3
HM129	F20069-A	L000468	France, Corsica					7	8		10						25	3
HM130	F20069-C	L000467	France, Corsica					7	8		10						25	3
HM131	F34042-D	L000551	France					4	8		9						21	3
HM132	GRC093-C	L000376	Greece					2	2			5					9	3
HM133	GRC098-A	L000375	Greece					7	10		10						27	3
HM134	SA02084	L000267	Greece					6	10		7						23	3
HM135	SA02748	L000332	Israel					6	10		9						25	3
HM136	SA02820	L000270	Turkey					7	9		10						26	3
HM137	SA03749	L000322	Israel					3	2		9						14	3
HM138	SA08454	L000283	Libya					2	7			10					19	3
HM139	SA08623	L000306	Morocco					4	6		10						20	3
HM140	SA09049	L000286	Libya					8	9		10						27	3
HM141	SA09456	L000044	Tunisie					10		7	8						25	3
HM142	SA09820	L000315	Libya					3	7		10						20	3
HM143	SA10481	L000132	Tunisie					8		6	8						22	3
HM144	SA15951	L000241	Portugal, Madeira					5	5		8						18	3
HM145	SA19964	L000146	Turkey					6		7	9						22	3
HM146	SA21302	L000237	Libya					3	1		9						13	3
HM147	SA21362	L000161	Libya					8		10	10						28	3
HM148	SA21590	L000162	Libya					6		6	9						21	3
HM149	SA21819	L000148	Cyprus					9		7	10						26	3
HM150	SA22323	L000238	Syria					5	3		4						12	3
HM151	SA25226	L000165	Italy					10		7	9						26	3
HM152	SA25654	L000166	Morocco					10		10	10						30	3

F. ANNEXES

HM153	SA25898	L000168	Italy					5	7		10						22	3
HM154	SA27778	L000173	Morocco					1	5			12					18	3
HM155	SA27961	L000216	Morocco					7	7		10						24	3
HM156	SA28089	L000217	Cyprus					5	7		10						22	3
HM157	SA28099	L000215	Cyprus					3	6		1	15					25	4
HM158	Salse46B	L000649	France					7	8		10						25	3
HM159	arboretu	L000680	France					6	7		5						18	3
HM160	CRE005-A	L000340	Greece, Crete					5	4		5						14	3
HM161	DZA033-2	L000365	Algeria					1	1		5						7	3
HM162	DZA055-H	L000538	Algeria					4	4		7						15	3
HM163	DZA061-11	L000358	Algeria					8	5		6						19	3
HM164	DZA215-5	L000350	Algeria					9	9		10						28	3
HM165	DZA231-1	L000344	Algeria					9	7		10						26	3
HM166	DZA236-2	L000343	Algeria					5	9		10						24	3
HM167	DZA242-A	L000341	Algeria					6	6		1						13	3
HM168	DZA323-3	L000400	Algeria					6	4		9						19	3
HM169	ESP039-A	L000404	Spain					8	5		10						23	3
HM170	ESP042-B	L000407	Spain					10	7		11						28	3
HM171	ESP045-A	L000409	Spain					7	8		5						20	3
HM172	ESP048-E	L000412	Spain					5	3			5					13	3
HM173	ESP048-F	L000411	Spain					7	7		6						20	3
HM174	ESP095-9	L000610	Spain					5	4		4						13	3
HM175	ESP098-B	L000510	Spain					10	9		9						28	3
HM176	ESP098-C	L000421	Spain					8	9		10						27	3
HM177	ESP100-G	L000425	Spain					7	6		7						20	3
HM178	ESP103-B	L000427	Spain					8	9								17	2
HM179	ESP162-A	L000438	Spain					10	6		11						27	3
HM180	ESP163-C	L000514	Spain					5	6		6						17	3
HM181	ESP175-D	L000448	Spain					5	7		10						22	3
HM182	F11013-A	L000451	France					3	6			3					12	3
HM183	F20015-8	L000517	France, Corsica					5	7		12						24	3
HM184	F20058-B	L000463	France, Corsica					8	10		10						28	3
HM185	F20081-A	L000470	France, Corsica					6	9		10						25	3
HM186	GRC024-H	L000387	Greece					8	9		10						27	3
HM187	GRC033-C	L000386	Greece					9	9		10						28	3
HM188	GRC040-1	L000383	Greece					4	5			4					13	3
HM189	PRT177-C	L000372	Portugal					9	9		10						28	3
HM190	SA02806	L000330	Portugal					4	6		10						20	3
HM191	SA03653	L000277	Portugal					3	2			11					16	3
HM192	SA07763	L000280	Tunisie					3	1		5						9	3

F. ANNEXES

HM193	SA08638	L000309	Morocco					1	1		5						7	3
HM194	SA09700	L000057	Tunisie					8		5	8						21	3
HM195	SA09728	L000313	Tunisie					8	10		10						28	3
HM196	SA09970	L000207	Tunisie					9	8		9						26	3
HM197	SA12455	L000246	Italy					4	7		10						21	3
HM198	SA18543	L000244	Tunisie					7	7		10						24	3
HM199	SA19983	L000147	Cyprus					9		9	10						28	3
HM200	SA19998	L000134	Cyprus					8		6	8						22	3
HM201	SA24576	L000233	Morocco					3	5			11					19	3
HM202	SA25941	L000226	Italy					10	9		10						29	3
HM203	SA27176	L000167	Greece					8		7	8						23	3
HM204	SA27185	L000172	Italy					2	1			6					9	3
HM205	SA28375	L000212	Portugal					8	8		11						27	3
HM206	Salse57A	L000650	France					9	10		9						28	3
HM207		Caliph	Cultivar										4	5	3		12	3
HM209		Sephi	Cultivar										5	4	5		14	3
HM210		TN1.1	Tunisia									9	11				20	2
HM211		TN1.17	Tunisia								5	5	5				15	3
HM212		TN1.3	Tunisia								10	7	11				28	3
HM213		TN7.11	Tunisia								9		8	5			22	3
HM215		TN7.17	Tunisia								10		9	7			26	3
HM216		TN7.18	Tunisia								10			8	7		25	3
HM217		TN7.19	Tunisia								9		11	8			28	3
HM218		TN7.2	Tunisia									8					8	1
HM219		TN7.20	Tunisia										9	10	8		27	3
HM220		TN7.22	Tunisia								8	7	9				24	3
HM221		TN7.23	Tunisia														0	0
HM222		TN7.4	Tunisia								9		7	5			21	3
HM223		TN8.15	Tunisia									7	7		9		23	3
HM224		TN8.21	Tunisia								9	8	8	10			35	4
HM225		TN8.22	Tunisia									10	11				21	2
HM226		TN8.23	Tunisia								10	9	10				29	3
HM227		TN8.24	Tunisia								8	9	7				24	3
HM228		TN8.25	Tunisia								10	9	7				26	3
HM229		TN8.28	Tunisia									3					3	1
HM230		TN8.4	Tunisia								9	8	4				21	3
HM231		TN8.5	Tunisia								7	2					9	2
HM232		TN9.12	Tunisia								4	8	9				21	3
HM234		TN9.17	Tunisia								9	3	10				22	3
HM235		TN9.20	Tunisia								8	7	8				23	3

F. ANNEXES

HM236		TN9.21	Tunisia									7	10			7	24	3
HM237		TN9.24	Tunisia									10	8	11			29	3
HM238		TN9.5	Tunisia									9	9	9			27	3
HM239		TN1.5	Tunisia									10	10	8			28	3
HM240		TN1.13	Tunisia									7	9	8	4		28	4
HM241		TN1.15	Tunisia										6	7		7	20	3
HM242		TN1.16	Tunisia										6	10		7	23	3
HM243		TN1.18	Tunisia										10				10	1
HM244		TN9.3	Tunisia									6	7	7			20	3
HM245		TN9.4	Tunisia										3				3	1
HM246		Chateaneu family 1	France											8	9	8	25	3
HM247		Chateaneu family 4	France											9	7	8	24	3
HM248		Lanautique family 3	France											10	8	6	24	3
HM280	Damas lines	D1.2.3	Syria									10	9	7			26	3
HM281	Damas lines	D2.2.2	Syria									9		5	8		22	3
HM282	Damas lines	D3.3.3	Syria									9		6	7		22	3
HM283	Damas lines	D4.2.1	Syria										8	10	7		25	3
HM284	Damas lines	D5.3.1	Syria									10	10	9			29	3
HM285	Damas lines	D6.2.1	Syria									10	9	9			28	3
HM286	Damas lines	D7.1.3	Syria									10	6	8			24	3
		TN9.9	Tunisia											9	10	7	26	3
		TN9.8	Tunisia									4					4	1
		TN9.19	Tunisia									8		8		6	22	3
		TN9.16	Tunisia									8		9	8		25	3
		TN9.1	Tunisia									10		9	7		26	3
		TN8.29	Tunisia									10		9	9		28	3
		TN8.20	Tunisia									8		9	7		24	3
		TN1.9	Tunisia									6					6	1
		TN1.8	Tunisia											9	8	10	27	3
		TN1.4	Tunisia									8		7	7		22	3
		TN1.20	Tunisia											9	3	9	21	3
		TN1.19	Tunisia									8		10	8		26	3
		TN1.14	Tunisia									8		6	9		23	3
		TN1.12	Tunisia									6		10	9		25	3
		TN9.7	Tunisia												4		4	1
Total plant number				199	412	830	672	660	545	107	707	514	308	514	254	178	5900	/

Tableau F-3 : Accessions issues de la population tunisienne Soliman de *Medicago truncatula* utilisées pour l'étude de génétique d'association.

Les coordonnées GPS ainsi que l'électro-conductivité des sols de prospections sont indiquées (W. Vu, Com. Pers.).

Accession	Longitude	Latitude	Elévation (m)	EC (dS/m)
MT_SOL005	10,450	36,714	45,381	NA
MT_SOL007	10,451	36,711	41,021	6,187
MT_SOL008	10,451	36,711	40,765	6,187
MT_SOL013	10,451	36,711	40,694	9,870
MT_SOL015	10,452	36,711	39,497	NA
MT_SOL016	10,452	36,711	39,390	NA
MT_SOL018	10,452	36,711	37,981	3,680
MT_SOL020	10,452	36,711	35,832	13,017
MT_SOL025	10,452	36,711	31,738	3,227
MT_SOL030	10,452	36,711	30,639	8,012
MT_SOL034	10,451	36,711	30,305	8,673
MT_SOL035	10,452	36,711	29,429	8,233
MT_SOL036	10,452	36,711	29,339	8,423
MT_SOL038	10,452	36,711	28,199	6,750
MT_SOL040	10,452	36,711	28,228	6,577
MT_SOL042	10,452	36,711	27,581	2,210
MT_SOL053	10,452	36,711	22,232	3,477
MT_SOL054	10,452	36,711	21,856	2,230
MT_SOL070	10,452	36,711	21,950	3,213
MT_SOL073	10,452	36,711	14,625	5,027
MT_SOL075	10,452	36,711	17,818	5,180
MT_SOL077	10,452	36,711	14,161	3,140
MT_SOL089	10,452	36,711	14,883	3,100
MT_SOL090	10,452	36,711	13,366	2,603
MT_SOL304	10,452	36,711	2,341	2,777
MT_SOL306	10,452	36,711	3,603	3,730
MT_SOL307	10,452	36,711	2,973	3,263
MT_SOL308	10,452	36,711	2,592	3,663
MT_SOL311	10,452	36,711	2,841	9,397
MT_SOL313	10,452	36,711	2,860	5,803
MT_SOL314	10,452	36,711	2,475	3,913
MT_SOL316	10,452	36,711	3,841	2,467
MT_SOL318	10,452	36,711	3,822	2,830
MT_SOL319	10,452	36,711	2,853	3,333
MT_SOL321	10,451	36,711	3,144	3,587
MT_SOL325	10,451	36,711	4,575	2,403
MT_SOL328	10,451	36,711	3,761	2,710
MT_SOL334	10,451	36,711	4,605	4,210
MT_SOL341	10,452	36,711	3,332	2,247
MT_SOL343	10,451	36,711	3,622	7,380
MT_SOL346	10,451	36,711	2,446	3,330
MT_SOL347	10,451	36,712	3,547	3,627
MT_SOL348	10,450	36,712	3,249	4,593
MT_SOL362	10,448	36,710	3,331	2,257
MT_SOL370	10,448	36,710	2,619	1,438
MT_SOL375	10,448	36,709	2,316	5,553
MT_SOL379	10,448	36,709	1,915	2,707
MT_SOL381	10,448	36,709	2,337	3,410
MT_SOL386	10,448	36,710	2,429	2,557
MT_SOL388	10,448	36,710	0,407	2,250
MT_SOL389	10,448	36,710	1,261	1,836
MT_SOL390	10,448	36,710	1,039	3,753
MT_SOL391	10,449	36,710	2,320	2,797
MT_SOL396	10,448	36,710	1,849	4,210
MT_SOL397	10,448	36,710	1,061	3,783

MT_SOL404	10,448	36,710	1,398	3,277
MT_SOL407	10,448	36,710	1,687	3,640
MT_SOL409	10,448	36,710	1,135	2,607
MT_SOL410	10,448	36,710	2,357	4,843
MT_SOL412	10,448	36,711	1,868	3,387
MT_SOL425	10,447	36,711	1,807	3,237
MT_SOL427	10,447	36,711	1,209	NA
MT_SOL431	10,447	36,711	1,681	4,020
MT_SOL433	10,447	36,711	1,135	2,893
MT_SOL434	10,447	36,711	2,524	2,933
MT_SOL445	10,447	36,710	0,423	9,353
MT_SOL446	10,447	36,710	-0,138	12,903
MT_SOL447	10,447	36,710	1,085	10,370
MT_SOL449	10,447	36,710	1,276	9,473
MT_SOL764	10,428	36,709	2,189	1,231
MT_SOL772	10,428	36,710	5,807	6,517
MT_SOL779	10,427	36,710	5,881	5,917
MT_SOL902	10,448	36,709	6,397	1,290
MT_SOL904	10,448	36,709	5,767	1,784
MT_SOL908	10,448	36,709	4,882	3,330
MT_SOL914	10,447	36,709	2,563	0,658
MT_SOL916	10,447	36,709	1,426	1,181
MT_SOL919	10,447	36,710	2,851	4,283
MT_SOL920	10,447	36,710	2,751	3,719
MT_SOL924	10,447	36,711	3,322	4,467
MT_SOL926	10,447	36,711	3,555	4,970
MT_SOL928	10,447	36,711	3,526	4,400
MT_SOL933	10,448	36,711	2,861	2,370
MT_SOL938	10,449	36,713	3,011	1,453
MT_SOL941	10,450	36,713	2,781	2,973
MT_SOL946	10,446	36,715	3,822	2,317
MT_SOL948	10,440	36,713	4,567	1,096
MT_SOL949	10,437	36,712	5,961	2,500
MT_SOL955	10,427	36,709	4,106	NA
MT_SOL957	10,427	36,710	4,644	NA

Tableau F-4 : Composition du milieu Murashige & Skoog, vitamines incluses (extrait de Murashige and Skoog, 1962).

Formule chimique	Quantité pour 1L de milieu (mg)	Concentration (μM)
Micro-éléments		
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,11
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,1
FeNaEDTA	36,7	100
H_3BO_3	6,2	100,27
KI	0,83	5
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	16,9	100
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	1,03
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6	29,91
Macro-éléments		
CaCl_2	332,02	2,99
KH_2PO_4	170	1,25
KNO_3	1900	18,79
MgSO_4	180,54	1,5
NH_4NO_3	1650	20,61
Vitamines		
Glycine	2	26,64
myo-Inositol	100	554,94
Nicotinic acid	0,5	4,06
Pyridoxine HCl	0,5	2,43
Thiamine HCl	0,1	0,3

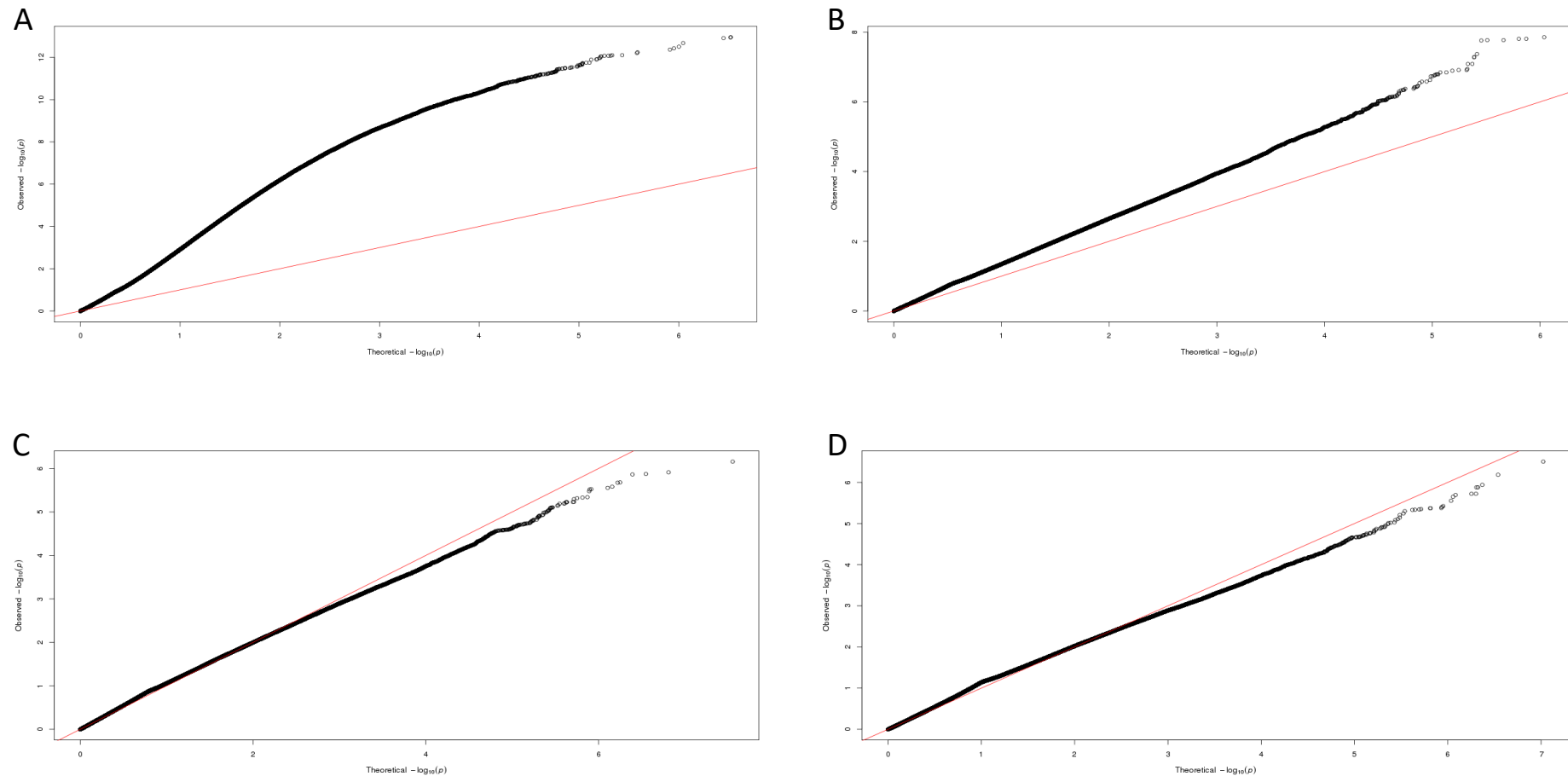


Figure F-1 : Q-Q plots des analyses de GWAS réalisées sur l'AUDPC avec les modèles GLM (A), GLM incluant la matrice de population (B), MLM (C) et MLM incluant la matrice de population (D).

Chaque point représente pour un SNP la valeur observée de la P -value en fonction de sa valeur théorique : plus les points suivent la bissectrice (représentée en rouge) et plus le modèle est performant.

AUDPC : Area Under the Disease Progress Curve. MLM : Modèle Linéaire Mixte, GLM : Modèle Généralisé Linéaire.

Tableau F-5 : Gènes candidats à la résistance à *Verticillium alfalfae* V31-2 identifiés par l'analyse de génétique d'association au sein de 246 accessions de la collection MtHapMap.

Ce tableau répertorie, pour chaque chromosome (Chr), les gènes situés dans une région de 10 Kb de part et d'autre des SNP(s) (Locus) possédant un score supérieur à 5 pour chacun des traits étudiés. Le score de chacun des SNPs correspond à $[-\log_{10}(P\text{-value})]$ et a été obtenu pour chacun des traits selon un modèle linéaire mixte incluant la structure de la population et l'apparentement entre les accessions. Les traits étudiés sont l'AUDPC, le MSS, le taux de réisolement, et les paramètres de modélisation Asym et xmid.

La colocalisation des SNPs et des QTLs de résistance à *Verticillium* sp. est également indiquée.

Les gènes dont le nom et l'annotation sont en gras correspondent aux gènes exprimés dans un pool de racines de *Medicago truncatula* A17 à 4, 8 et 24 heures après inoculation par Va V31-2 selon l'analyse de transcriptomique haut-débit réalisée par (Toueni *et al.*, 2016).

Chr	Locus	Trait	Score	Genes	Position du(es) gène(s)	Annotation	QTLs
chr.1	15414205	AUDPC	5,37	Medtr1g041340 Medtr1g041345	chr1:15402631..15404193 (- strand) chr1:15404901..15413626 (+ strand)	eukaryotic translation initiation factor 2c hypothetical protein	
	15414207	AUDPC	5,42				
		Asym	5,2				
	15814830	AUDPC	5,35	Medtr1g042200 Medtr1g042160	chr1:15813194..15814126 (- strand) chr1:15824709..15827639 (+ strand)	Nodule Cysteine-Rich (NCR) secreted peptide MATH domain protein	
		MSS	5,23				
		Asym	5				
	15822629	AUDPC	5,34	Medtr1g042160	chr1:15824709..15827639 (+ strand)	MATH domain protein	
	20431026	Taux de réisolement	6,19	Medtr1g051520	chr1:20431602..20431910 (+ strand)	D-arabinono-1,4-lactone oxidase family protein, putative	
	26209581	xmid	5,96	Medtr1g060190	chr1:26203086..26206613 (- strand)	terminal flower 1	
	45751921	AUDPC	6,5	Medtr1g101287 Medtr1g101310	chr1:45750717..45751056 (+ strand) chr1:45761926..45764419 (+ strand)	transmembrane protein, putative inactive rhomboid-like protein	QTL LPP0323 LR5 (Negahi <i>et al.</i> , 2014)
		MSS	5,35				
		Asym	5,24				
	47505030	Asym	5,14	Medtr1g105510 Medtr1g105515 Medtr1g105520	chr1:47510621..47511213 (- strand) chr1:47514359..47515150 (- strand)	transmembrane protein, putative ubiquitin family protein transmembrane protein, putative	
chr. 2	2623214	AUDPC	5,01	Medtr2g011040	chr2:2622129..2623988 (+ strand)	viral movement protein	
	15745858	Taux de réisolement	5	Medtr2g036340 Medtr2g036350 Medtr2g036380	chr2:15741441..15741806 (- strand) chr2:15742335..15744015 (- strand) chr2:15750414..15755711 (+ strand)	NADH dehydrogenase (ubiquinone)S protein, putative MIT domain protein heavy metal ATPase transporter	
	31504757	xmid	5,08	Medtr2g075340	chr2:31491297..31499138 (- strand)	hypothetical protein	
	37384969	xmid	5,63	Medtr2g088655	chr2:37383418..37387414 (+ strand)	hypothetical protein	
chr. 3	4216658	Taux de réisolement	5,07	Medtr3g014680	chr3:4210793..4217003 (- strand)	transglutaminase family protein	
	5635709	xmid	5	Medtr3g019810	chr3:5633198..5636393 (+ strand)	germin family 3 protein	
	5847255	xmid	5,08	Medtr3g020320	chr3:5847709..5851590 (+ strand)	S-locus lectin kinase family protein	
	10534803	xmid	5,03	Medtr3g033130 Medtr3g033160	chr3:10526729..10532558 (+ strand) chr3:10539695..10541622 (+ strand)	NB-ARC domain disease resistance protein, putative hypothetical protein	
	10599206	xmid	5,03	Medtr3g033260	chr3:10594407..10594865 (+ strand)	Nodule Cysteine-Rich (NCR) secreted peptide	
	13838526	Taux de réisolement	5,08	Medtr3g037650 Medtr3g037670 Medtr3g037690	chr3:13829626..13832376 (+ strand) chr3:13844925..13851426 (- strand) chr3:13852857..13855884 (+ strand)	late embryogenesis abundant protein HMG (high mobility group) box protein receptor-like kinase	
	14887006	xmid	6,2	Medtr3g041560	chr3:14894266..14897229 (- strand)	leucine-rich receptor-like kinase family protein	
	16373531	xmid	5,15	Medtr3g448670	chr3:16367948..16368644 (- strand)	hypothetical protein	
	28034712	Taux de réisolement	5,25	Medtr3g062130 Medtr3g062140	chr3:28035633..28038431 (+ strand) chr3:28045165..28058310 (+ strand)	hypothetical protein LRR and NB-ARC domain disease resistance protein	

Chr	Locus	Trait	Score	Genes	Position du(es) gène(s)	Annotation	QTLs
chr. 3	46908377	AUDPC	5,24	Medtr3g101790 Medtr3g101820	chr3:46880341..46887729 (- strand) chr3:46902751..46903162 (+ strand)	THO complex, protein elongation factor, putative	
	48628352	AUDPC	5,11	Medtr3g105440 Medtr3g105470	chr3:48619239..48625562 (- strand) chr3:48636150..48642452 (+ strand)	3beta-hydroxysteroid-dehydrogenase/decarboxylase DNA cross-link repair protein pso2/SNM1, putative	
	52552732	xmid	5	Medtr3g112220 Medtr3g112230	chr3:52551663..52552541 (+ strand) chr3:52555883..52559879 (+ strand)	ZIP transcription factor ubiquitin-protein ligase	
	53956515	xmid	5,48	Medtr3g115380	chr3:53956064..53957131 (- strand)	hypothetical protein	
chr. 4	4230490	Taux de réisolement	5,23	Medtr4g014810	chr4:4230241..4233497 (- strand)	GTP-binding elongation factor Tu family protein	
	4325427	xmid	5,04	Medtr4g014990 Medtr4g015020 Medtr4g015030	chr4:4318012..4324381 (- strand) chr4:4330290..4330565 (+ strand) chr4:4332186..4338958 (+ strand)	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) NB-ARC domain disease resistance protein disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class)	
	21200499	xmid	5,26	Medtr4g057675 Medtr4g057680 Medtr4g057685	chr4:21196726..21199077 (- strand) chr4:21205351..21205848 (+ strand) chr4:21208948..21217149 (- strand)	anthranilate phosphoribosyltransferase-like protein Nodule Cysteine-Rich (NCR) secreted peptide lactoylglutathione lyase-like protein	
	22247792	xmid	5,12	Medtr4g060490	chr4:22247419..22248394 (- strand)	hypothetical protein	
	23046196	AUDPC	5,21	Medtr4g062100 Medtr4g062130	chr4:23031203..23035155 (- strand) chr4:23049503..23053591 (- strand)	ankyrin repeat plant protein nudix hydrolase-like protein	
		MSS	5,17				
		Asym	5,09				
	41333155	xmid	5,04	Medtr4g099520	chr4:41338141..41339946 (- strand)	hypothetical protein	
chr. 5	7997784	xmid	5,33	Medtr5g020860 Medtr5g020870	chr5:7995952..7996710 (+ strand) chr5:7998293..8003187 (+ strand)	plant/F18B3-190 protein, putative hypothetical protein	
	8001858	xmid	5,63	Medtr5g020870	chr5:7998293..8003187 (+ strand)	plant/F18B3-190 protein, putative	
	9329864	xmid	5,29	Medtr5g023460 Medtr5g023470 Medtr5g023480	chr5:9328933..9329511 (+ strand) chr5:9331402..9332447 (- strand) chr5:9334377..9334697 (+ strand)	DUF241 domain protein DUF241 domain protein hypothetical protein	
	9354437	xmid	5,06	Medtr5g023530 Medtr5g023540	chr5:9351170..9352180 (- strand) chr5:9354730..9354994 (- strand)	DUF241 domain protein transmembrane protein, putative DUF241 domain protein	
	9354633		5,51	Medtr5g023550			
	26508167	xmid	5,24	Medtr5g063910	chr5:26507844..26508401 (- strand)	hypothetical protein	
	40467083	xmid	5,9	Medtr5g092630	chr5:40456777..40458560 (- strand)	toll/interleukin-like receptor-protein	
	43196970	AUDPC	5,88	Medtr5g098680 Medtr5g098690 Medtr5g098710	chr5:43190265..43195189 (- strand) chr5:43199729..43200759 (+ strand) chr5:43201557..43209592 (- strand)	E3 ubiquitin-protein ligase orthrus-like protein hypothetical protein hypothetical protein	
chr. 6	2415181	xmid	5,26	Medtr6g008790	chr6:2425279..2427147 (- strand)	transmembrane protein, putative	
	5099756	xmid	6,56	Medtr6g015430 Medtr6g015435	chr6:5088033..5098922 (+ strand) chr6:5100731..5108119 (- strand)	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class)	
	5100116	xmid	5,3				
	5100401	xmid	5				
	6796183	xmid	5	Medtr6g017165	chr6:6797730..6800407 (+ strand)	allene oxide cyclase	
	7048646	xmid	5,7	Medtr6g018400	chr6:7045960..7048627 (- strand)	F-box SKIP23-like protein	
	8002111	xmid	5,06	Medtr6g022830 Medtr6g022840	chr6:7994631..7998187 (- strand) chr6:7998883..7999272 (- strand)	ankyrin repeat protein Ycf2; ATPase, AAA type, core protein	
	12658203	xmid	5,41	Medtr6g035325	chr6:12653306..12654191 (- strand)	transmembrane protein, putative	
	14196209	xmid	5,32	Medtr6g034830 Medtr6g034720 Medtr6g034730	chr6:14192938..14193297 (- strand) chr6:14197314..14198144 (- strand) chr6:14200273..14200662 (+ strand)	galactose oxidase, putative F-box protein interaction domain protein Hhh-GPD base excision DNA repair family protein	
	19111221	xmid	6,04	Medtr6g053210 Medtr6g053230	chr6:19105122..19106870 (+ strand) chr6:19113774..19115468 (- strand)	hypothetical protein transmembrane protein, putative F-box protein interaction domain protein	
				Medtr6g053240			

Chr	Locus	Trait	Score	Genes	Position du(es) gène(s)	Annotation	QTLs
chr. 7	2348137	AUDPC	5,15	Medtr7g010020 Medtr7g010040	chr7:2340754..2343858 (- strand) chr7:2353424..2354956 (+ strand)	homeobox leucine zipper ATHB-like protein hypothetical protein	
	5823049	Taux de réisolement	5,02	Medtr7g018130	chr7:5820244..5823275 (+ strand)	tyrosine kinase family protein	
	9895183	AUDPC	5,72	Medtr7g028755 Medtr7g028780	chr7:9882308..9889385 (- strand) chr7:9902380..9902952 (+ strand)	transmembrane protein, putative hypothetical protein	
		MSS	5,55				
		Asym	5,6				
	15637404	xmid	5,84	Medtr7g446070	chr7:15636997..15638025 (- strand)	GATA type zinc finger transcription factor family protein	
	20017260	xmid	5,14	Medtr7g056450 Medtr7g056453 Medtr7g056460 Medtr7g056463 Medtr7g056467 Medtr7g056473 Medtr7g056480 Medtr7g056493 Medtr7g056500	chr7:20004468..20007929 (- strand) chr7:20011824..20012212 (- strand) chr7:20022555..20022824 (+ strand) chr7:20025129..20027522 (- strand) chr7:20028077..20028389 (+ strand) chr7:20032952..20033639 (+ strand) chr7:20038549..20039038 (+ strand) chr7:20048715..20049189 (+ strand) chr7:20054294..20054769 (+ strand)	S-locus lectin kinase family protein hypothetical protein leguminosin group567 LEED...PEED secreted peptide hypothetical protein hypothetical protein leguminosin group567 LEED...PEED secreted peptide leguminosin group567 LEED...PEED secreted peptide leguminosin group567 LEED...PEED secreted peptide leguminosin group567 LEED...PEED secreted peptide	QTLV31.2 LR5 (Ben <i>et al.</i> , 2013a)
	20019141		5,57				
	20019147		5,7				
	20021012		5,78				
	20034680		5,42				
	20050636		7,33				
	25545277	xmid	5,56	Medtr7g069310 Medtr7g069390	chr7:25543816..25544573 (- strand) chr7:25548129..25553250 (+ strand)	PPR repeat protein proliferation-associated 2G4-like protein	
	26003525	AUDPC	5,72	Medtr7g070425 Medtr7g070440 Medtr7g070450 Medtr7g070470 Medtr7g070480	chr7:25998424..25998844 (+ strand) chr7:26002830..26003951 (- strand) chr7:26005861..26006253 (- strand) chr7:26017433..26017651 (- strand) chr7:26018713..26021238 (+ strand)	F-box protein interaction domain protein transmembrane protein, putative hypothetical protein SEC14 cytosolic factor family protein	QTLV31.2 LR5,LR4 (Ben <i>et al.</i> , 2013a)
		MSS	5,12				
	26003799	AUDPC	5,33				
	26017801	AUDPC	5,88				
		MSS	5,32				
	26017803	AUDPC	5,4				
		MSS	5,09				
	26017843	AUDPC	5,3				
	26017929	MSS	5,15				
	26022623	AUDPC	5,69				
	26022633	AUDPC	5,64				
	26022763	AUDPC	5,94				
	26023171	AUDPC	5,38				
	26023264	AUDPC	5,33				
	26028436	AUDPC	5,02	Medtr7g070500	chr7:26029355..26032258 (+ strand)	aldo/keto reductase family oxidoreductase	
	30295994	Taux de réisolement	5,13	Medtr7g079750 Medtr7g079770	chr7:30292750..30294139 (- strand) chr7:30297539..30300197 (+ strand)	transmembrane protein, putative vicilin 47 kDa protein	
	32936562	AUDPC	5,08	Medtr7g085180 Medtr7g085200	chr7:32932071..32936484 (+ strand) chr7:32940108..32943998 (+ strand)	Nod factor-binding lectin-nucleotide phosphohydrolase Nod factor-binding lectin-nucleotide phosphohydrolase	
	35582386	AUDPC	5,02	Medtr7g090420 Medtr7g090430	chr7:35574005..35574881 (- strand) chr7:35582799..35583108 (- strand)	hypothetical protein hypothetical protein	
		MSS	5,26				
		Asym	5,41				

Chr	Locus	Trait	Score	Genes	Position du(es) gène(s)	Annotation	QTLs
chr. 8	3160784	xmid	5,57	Medtr8g011580	chr8:3157931..3160836 (+ strand)	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP62-like protein	
	9538772	xmid	5,58	Medtr8g027140 Medtr8g027150	chr8:9532608..9537848 (+ strand) chr8:9538952..9542067 (+ strand)	spotted leaf protein, putative PPR containing plant-like protein	
	16677735	xmid	5	Medtr8g043450	chr8:16677438..16680605 (- strand)	Pre-rRNA-processing protein TSR2, motif protein	
	20377394	AUDPC	6,18	Medtr8g058830	chr8:20375903..20376505 (+ strand)	hypothetical protein	
		MSS	5,23				
		Asym	5,46				
	25705380	xmid	5,56	Medtr8g470540	chr8:25703876..25704900 (- strand)	leucine-rich receptor-like kinase family protein	
	32167062	AUDPC	5,55	Medtr8g076040	chr8:32168346..32169000 (+ strand)	SAUR-like auxin-responsive family protein	
	33945886	AUDPC	5,37	Medtr8g079360	chr8:33950455..33954004 (+ strand)	LRR and NB-ARC domain disease resistance protein	
		MSS	6,13				
		Asym	6,08				
	42655333	xmid	5,59	Medtr8g101520	chr8:42657536..42658459 (- strand)	SAUR-like auxin-responsive family protein	

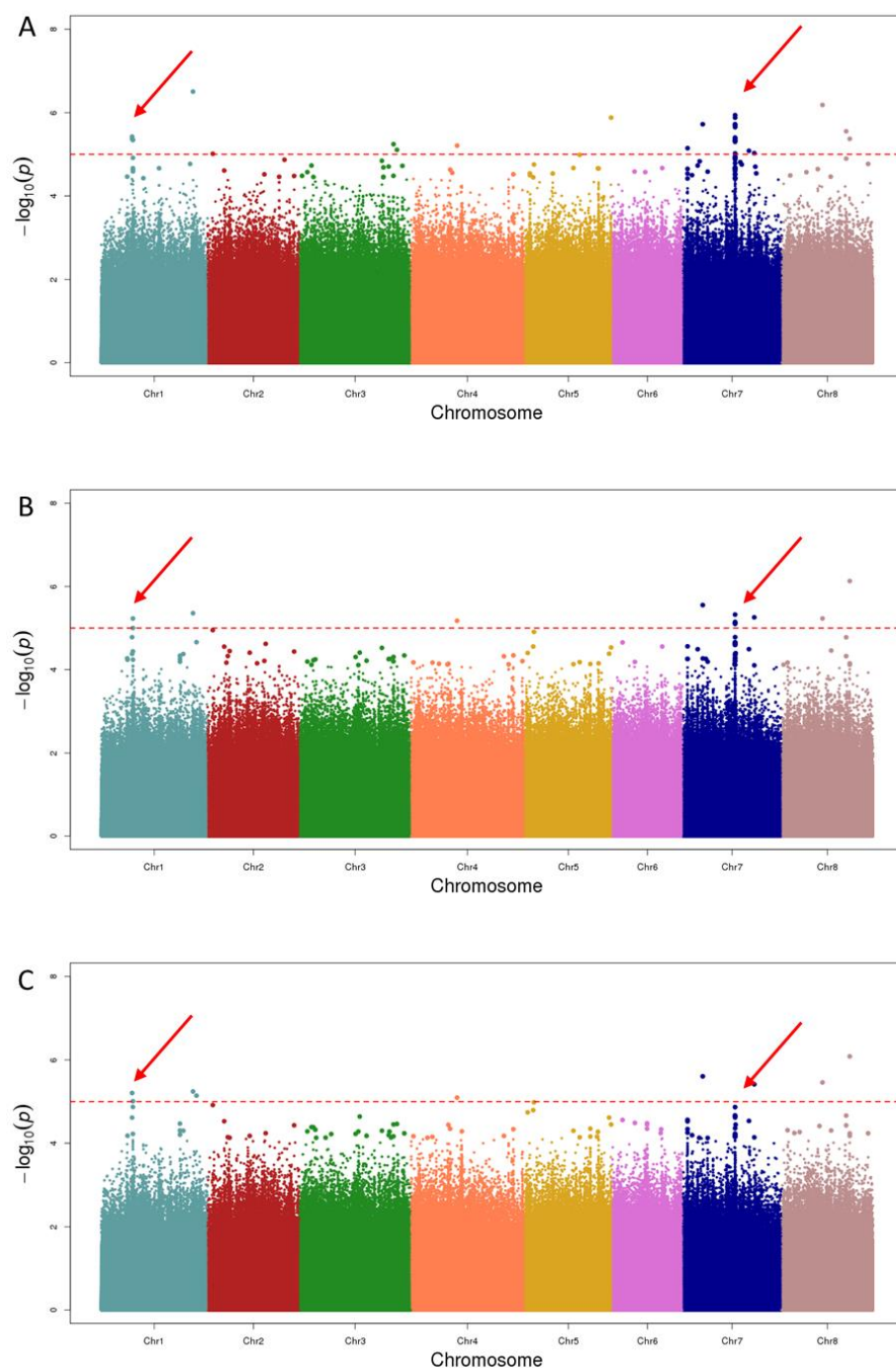


Figure F-2 : Manhattan plots obtenus suite à l'analyse de GWAS de la réponse à *Verticillium alfalfae* V31-2 au sein de l'espèce *Medicago truncatula* pour les phénotypes AUDPC (A), MSS (B) et pour le paramètre de modélisation Asym (C).

Ces phénotypes ont été évalués chez 246 accessions de la collection *MtHapMap*. L'analyse de génétique d'association a été réalisée selon un modèle linéaire mixte incluant la structure de la population et l'apparentement entre les accessions.

L'axe horizontal représente la longueur des chromosomes. Chaque point représente la probabilité que le SNP soit lié au phénotype étudié. Les 100 SNPs les plus significatifs sont représentés par des points de plus grosse taille, la ligne rouge marque le seuil arbitraire de 5. Les mêmes QTLs au niveau des chromosomes 1 et 7 ont été identifiés pour ces trois paramètres de maladie liés à l'évolution des symptômes de flétrissement foliaire (flèches rouges).

MSS : Maximum Symptom Score, AUDPC : Area Under the Disease Progress Curve.

Tableau F-6 : Rendement en nombre de gousses des lignées de RILs LR4 et LR5 hétérozygotes sous le QTL de résistance à *Verticillium alfalfae* V31-2.

Les individus pour lesquels plus de dix gousses ont été obtenues seront génotypés. La réponse à Va V31-2 de leur descendance a été évaluée en deux expériences indépendantes. Les plantes phénotypées seront prochainement génotypées.

LR5 : A17 [R] x F83005.5 [S]

Lignées	# de gousses	Lignées	# de gousses
LR5-2_1	0	LR5-100_3	47
LR5-2_2	0	LR5-100_4	7
LR5-2_3	1	LR5-100_5	8
LR5-2_4	2	LR5-100_6	16
LR5-2_5	3	LR5-100_7	3
LR5-2_6	0	LR5-100_8	15
LR5-2_7	6	LR5-100_9	9
LR5-2_8	3	LR5-100_10	0
LR5-2_9	6	LR5-100_11	0
LR5-2_10	33	LR5-100_12	1
LR5-2_11	29	LR5-100_13	7
LR5-2_12	0	LR5-100_14	0
LR5-2_13	4	LR5-100_15	0
LR5-2_14	10	LR5-100_16	0
LR5-2_15	2	LR5-100_17	0
LR5-2_16	5	LR5-100_18	6
LR5-2_17	4	LR5-100_19	0
LR5-2_18	0	LR5-100_20	0
LR5-2_19	0	LR5-100_21	1
LR5-2_20	4	LR5-100_22	2
LR5-2_21	0	LR5-142_1	4
LR5-39_1	0	LR5-142_2	33
LR5-39_2	5	LR5-142_3	11
LR5-39_3	1	LR5-142_4	39
LR5-39_4	0	LR5-142_5	17
LR5-39_5	3	LR5-142_6	32
LR5-39_6	2	LR5-142_7	12
LR5-39_7	0	LR5-142_8	6
LR5-39_8	0	LR5-142_9	53
LR5-39_9	9	LR5-142_10	6
LR5-39_10	0	LR5-142_11	52
LR5-79_1	0	LR5-142_12	44
LR5-79_2	2	LR5-142_13	4
LR5-79_3	1	LR5-142_14	24
LR5-79_4	0	LR5-142_15	2
LR5-79_5	0	LR5-142_16	16
LR5-79_6	4	LR5-142_17	12
LR5-79_7	14	LR5-142_18	19
LR5-79_8	0	LR5-142_19	10
LR5-79_9	0	LR5-142_20	5
LR5-100_1	2	LR5-142_21	39
LR5-100_2	33	LR5-142_22	2

LR4 : A17 [R] x DZA315.16 [S]

Lignées	# de gousses	Lignées	# de gousses
LR4-3_1	57	LR4-40_31	2
LR4-3_2	0	LR4-40_32	3
LR4-3_3	0	LR4-40_33	2
LR4-3_4	1	LR4-100_1	1
LR4-3_5	0	LR4-100_2	19
LR4-3_6	46	LR4-100_3	46
LR4-3_7	0	LR4-100_4	3
LR4-3_8	0	LR4-100_5	69
LR4-3_9	58	LR4-100_6	20
LR4-3_10	1	LR4-100_7	1
LR4-3_11	4	LR4-100_8	0
LR4-3_12	0		
LR4-40_1	31		
LR4-40_2	52		
LR4-40_3	22		
LR4-40_4	45		
LR4-40_5	12		
LR4-40_6	26		
LR4-40_7	0		
LR4-40_8	2		
LR4-40_9	36		
LR4-40_10	1		
LR4-40_11	43		
LR4-40_12	40		
LR4-40_13	30		
LR4-40_14	34		
LR4-40_15	0		
LR4-40_16	112		
LR4-40_17	22		
LR4-40_18	60		
LR4-40_19	94		
LR4-40_20	100		
LR4-40_21	90		
LR4-40_22	113		
LR4-40_23	73		
LR4-40_24	25		
LR4-40_25	0		
LR4-40_26	6		
LR4-40_27	0		
LR4-40_28	1		
LR4-40_29	2		
LR4-40_30	6		

Tableau F-7 : Gènes candidats à la résistance à *Verticillium alfalfae* V31-2 identifiés par l'analyse d'association au sein de la population Soliman.

Ce tableau répertorie, pour chaque chromosome (Chr), les gènes situés dans une région de 10 Kb de part et d'autre des SNP(s) (Locus) possédant un score supérieur à 4 pour chacun des traits étudiés. Le score de chacun des SNPs correspond à $[-\log_{10}(P\text{-value})]$ et a été obtenu pour chacun des traits selon un modèle linéaire généralisé. Les traits étudiés sont l'AUDPC, le MSS et le taux de réisolement. Aucun des SNPs ne colocalise avec des QTLs de résistance à *Verticillium* sp. précédemment décrit.

Les gènes dont le nom et l'annotation sont en gras correspondent aux gènes exprimés dans un pool de racines de *Medicago truncatula* A17 à 4, 8 et 24 heures après inoculation par *Va* V31-2 selon l'analyse de transcriptomique haut-débit réalisée par (Toueni *et al.*, 2016).

Chr	Locus	Trait	Score	Gène(s)	Position du(es) gène(s)	Annotation
Chr. 1	2258862	AUDPC	4,201	Medtr1g011880	chr1:2251690..2255411 (+ strand)	cytochrome B-c1 complex subunit 7
		MSS	4,905			
	6023036	AUDPC	4,249	Medtr1g019770 Medtr1g019780	chr1:6018832..6022603 (- strand) chr1:6024487..6031917 (+ strand)	origin recognition complex second largest subunit 2 plant/F17M5-140 protein
	8401310	AUDPC	5,096	Medtr1g026075	chr1:8403017..8403813 (+ strand)	calcium-dependent kinase family protein
		MSS	4,345			
	11127040	Taux de réisolement	4,353	Medtr1g031730	chr1:11122285..11127957 (- strand)	DNA-directed RNA polymerase III subunit Rpc31
	22687049	Taux de réisolement	4,119	Medtr1g053715	chr1:22678198..22682537 (- strand)	squamosa promoter-binding-like protein
	24670389	MSS	4,048	Medtr1g056370	chr1:24669103..24669749 (- strand)	disease resistance response protein
	33453115	MSS	4,438	Medtr1g075540	chr1:33453001..33457614 (- strand)	peroxisomal membrane 22 kDa (Mpv17/PMP22) family protein
Chr. 2	44762497	MSS	4,258	Medtr1g099220	chr1:44766991..44778263 (- strand)	chromosome condensation regulator RCC1 repeat protein
	10000166	AUDPC	4,248	Medtr2g027360 Medtr2g027390	chr2:9993635..10000488 (+ strand) chr2:10005512..10008434 (+ strand)	C2 and GRAM domain plant-like protein nuclear inhibitor of protein phosphatase
	14538477	MSS	4,287	Medtr2g437200	chr2:1450683..1456854 (+ strand)	mTERF protein
		Taux de réisolement	5,260			
	15074727	AUDPC	4,264	Medtr2g035620	chr2:14551849..14553616 (+ strand)	PPR containing plant protein
	21558026	MSS	4,574	Medtr2g049020	chr2:21558019..21563031 (- strand)	inositol transporter 4
		Taux de réisolement	5,220			
Chr. 3	31249845	AUDPC	4,512	Medtr2g073640 Medtr2g073650	chr2:31241382..31248943 (- strand) chr2:31250170..31258536 (- strand)	LRR receptor-like kinase LRR receptor-like kinase
		MSS	4,635			
	4672112	Taux de réisolement	4,738	Medtr3g015877	chr3:4667263..4667601 (- strand)	Nodule Cysteine-Rich (NCR) secreted peptide
	4997711	MSS	4,878	Medtr3g017500	chr3:4986754..4993371 (- strand)	calcium-dependent ARF-type GTPase activating family protein
	5051821	MSS	4,051	Medtr3g017620	chr3:5051049..5052879 (+ strand)	NB-ARC domain disease resistance protein
	5789006	AUDPC	4,555	Medtr3g020230	chr3:5801312..5804785 (+ strand)	S-locus lectin kinase family protein
		MSS	4,190			
	12530904	MSS	4,066	Medtr3g437110	chr3:12518817..12526435 (- strand)	crossover junction endodeoxyribonuclease, putative
	26076595	Taux de réisolement	4,231	Medtr3g464770	chr3:26072520..26082127 (+ strand)	fructose-6-phosphate-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase
	29404325	AUDPC	5,203	Medtr3g065180	chr3:29404315..29405648 (+ strand)	zinc finger, C3HC4 type (RING finger) protein
		MSS	5,732			
Chr. 4	30238658	AUDPC	4,414	Medtr3g067645	chr3:30238909..30240791 (+ strand)	F-box/LRR protein
		MSS	4,916			
	6045496	Taux de réisolement	4,381	Medtr4g019370	chr4:6040082..6046125 (+ strand)	myb transcription factor
	9111050	AUDPC	4,289	Medtr4g026485	chr4:9111815..9114789 (+ strand)	GRAS family transcription regulator
		MSS	4,335			
	9111052	AUDPC	4,145			
		MSS	4,137			
	42158992	MSS	4,235	Medtr4g101920	chr4:42163145..42167255 (- strand)	SNARE associated family protein

Chr	Locus	Trait	Score	Gène(s)	Position du(es) gène(s)	Annotation
Chr. 5	5071453	AUDPC	4,010	Medtr5g014910	chr5:5075537..5077437 (+ strand)	coatomer subunit beta-like protein, putative
		MSS	4,430			
	6993695	Taux de réisolement	4,019	Medtr5g018750	chr5:7004380..7005050 (+ strand)	DUF4228 domain protein
	15638458	AUDPC	4,181	Medtr5g035980	chr5:15642825..15644475 (+ strand)	transducin/WD40 repeat protein
		MSS	4,536			
	21276936	AUDPC	5,040	Medtr5g048570 Medtr5g048670	chr5:21260059..21265191 (+ strand) chr5:21286770..21289896 (- strand)	2OG-Fe(II) oxygenase family oxidoreductase replication factor-A protein 1, amine-terminal domain protein
		MSS	5,281			
	21389172	MSS	4,094	Medtr5g048910	chr5:21378699..21381637 (- strand)	hypothetical protein
	36224112	Taux de réisolement	4,432	Medtr5g083940	chr5:36224047..36225709 (- strand)	F-box protein interaction domain protein
	36224113		4,432			
Chr. 6	3069976	AUDPC	4,249	Medtr6g011180	chr6:3070122..3075774 (- strand)	hypothetical protein
		MSS	4,235			
	9449765	AUDPC	4,472	Medtr6g027480	chr6:9461945..9463358 (+ strand)	transmembrane protein, putative
		MSS	4,860			
	9449775	MSS	4,562	Medtr6g043630	chr6:13257342..13264188 (- strand)	dentin sialophosphoprotein
	13259388	AUDPC	4,124			
		MSS	4,126	Medtr6g039440	chr6:14264699..14268159 (- strand)	sesquiterpene synthase
	14259305	MSS	5,538			
	23071369	Taux de réisolement	4,060	Medtr6g465150	chr6:23059765..23065003 (- strand)	zinc finger CCCH domain protein
Chr. 7	24096077	AUDPC	4,527	Medtr6g065100	chr6:24103958..24105064 (+ strand)	PPR containing plant-like protein
		MSS	5,024			
	24468643	MSS	4,747	Medtr6g066100	chr6:24475640..24478307 (+ strand)	transmembrane protein, putative
	28907310	AUDPC	4,293	Medtr6g478080	chr6:28899364..28906820 (+ strand)	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class)
	5511043	AUDPC	4,477	Medtr7g017360	chr7:5507713..5512620 (+ strand)	phosphatidylinositol 3- and 4-kinase
		MSS	5,131			
	7173925	MSS	4,244	Medtr7g022310	chr7:7173609..7182541 (+ strand)	sphingosine-1-phosphate lyase
	7953647	AUDPC	4,776	Medtr7g024280 Medtr7g024290	chr7:7966470..7967571 (- strand) chr7:7969039..7971938 (- strand)	enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein seven in absentia family protein
		MSS	4,234			
Chr. 8	8825638	Taux de réisolement	4,187	Medtr7g026620	chr7:8821320..8824161 (+ strand)	chromatin remodeling protein, putative
	17017122	Taux de réisolement	5,095	Medtr7g450880	chr7:17012233..17013813 (+ strand)	plant OB fold protein, putative
	18059502	MSS	4,573	Medtr7g051510	chr7:18058241..18066934 (- strand)	glycoside hydrolase family 1 protein
	28282497	Taux de réisolement	5,048	Medtr7g075520	chr7:28277213..28282940 (- strand)	AAA-type ATPase family protein
	1367332	AUDPC	4,909	Medtr8g007235	chr8:1366875..1369594 (- strand)	nucleoside diphosphate kinase-like protein
		MSS	5,124			
	1901128	Taux de réisolement	4,329	Medtr8g008820	chr8:1899290..1903705 (+ strand)	receptor-like kinase plant
	12717859	AUDPC	4,222	Medtr8g033140	chr8:12723876..12725168 (+ strand)	F-box protein interaction domain protein
Chr. 8	14062877	AUDPC	4,030	Medtr8g037923	chr8:14059038..14063483 (- strand)	DUF247 domain protein
	30684191	Taux de réisolement	4,228	Medtr8g072600	chr8:30687757..30693585 (- strand)	serine/threonine-protein phosphatase
	31811727	MSS	4,078	Medtr8g075250	chr8:31809006..31815514 (+ strand)	cell cycle checkpoint protein RAD17, putative
		Taux de réisolement	4,211			
	35409616	Taux de réisolement	4,373	Medtr8g085480	chr8:35410388..35413830 (+ strand)	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase superfamily protein

Résultats des recherches d'orthologues aux gènes candidats à la résistance à *Verticillium alfalfae* V31-2 chez *Arabidopsis thaliana* et *Nicotiana* sp.

Arabidopsis thaliana

Chez *Arabidopsis thaliana*, un orthologue au gène Medtr7g070480 codant pour une protéine SEC14 a été identifié dans la version TAIR10 du génome de l'accèsion de référence Col-0 (<https://www.arabidopsis.org/Blast/>) : AT3G51670 (chr3 :19168672..19171227) codant une patelline 6. La séquence de cette protéine d'une longueur de 409 acides aminés présente 70% d'homologie avec la protéine SEC14 codée par Medtr7g070480.

Comme chez *Lotus japonicus*, le gène Medtr7g070440 codant pour une protéine F-BOX ne possède pas d'orthologue. La protéine codée par le gène AT3G06240 (chr3 :1887043..1888807) ne possède que 26% d'homologie avec la protéine F-BOX candidate à la résistance à la verticilliose chez *Medicago truncatula*.

Nicotiana sp.

Les blastp chez *Nicotiana benthamiana* (<https://solgenomics.net/tools/blast/>, v1.0.1) ont révélé la présence de deux gènes orthologues à Medtr7g070480. Les gènes Niben101Scf02430g00010 et Niben101Scf01297g03001 codent tous les deux des protéines de transfert de phosphatidylinositol SFH5 d'une longueur de 399 acides aminés et présentant respectivement 73,82 et 73,33% d'homologie avec la protéine SEC14 codée par Medtr7g070480.

La protéine F-BOX encodée par Medtr7g070440 ne possède pas non plus d'orthologue proche chez *Nicotiana benthamiana*. La protéine F-box la plus semblable à notre candidate (Niben101Scf16812g00007) présente une longueur de 569 acides aminés et 33,75% d'homologie de séquence.

Chez *Nicotiana tabacum* (var. K326, <https://solgenomics.net/tools/blast/>, v4.5), deux orthologues à Medtr7g070480 existent : Nitab4.5_0000047g0180 (protéine d'une longueur de 416 acides aminés) et Nitab4.5_0001226g0080 (protéine d'une longueur de 400 acides aminés) présentant respectivement 76,79 et 73,58% d'homologie de séquence à la SEC14 codée par Medtr7g070480.

Le plus proche orthologue du gène Medtr7g070440 chez *Nicotiana tabacum* est Nitab4.5_0000191g0060, les protéines encodées par ces gènes présentent 32,80% d'homologie de séquence.

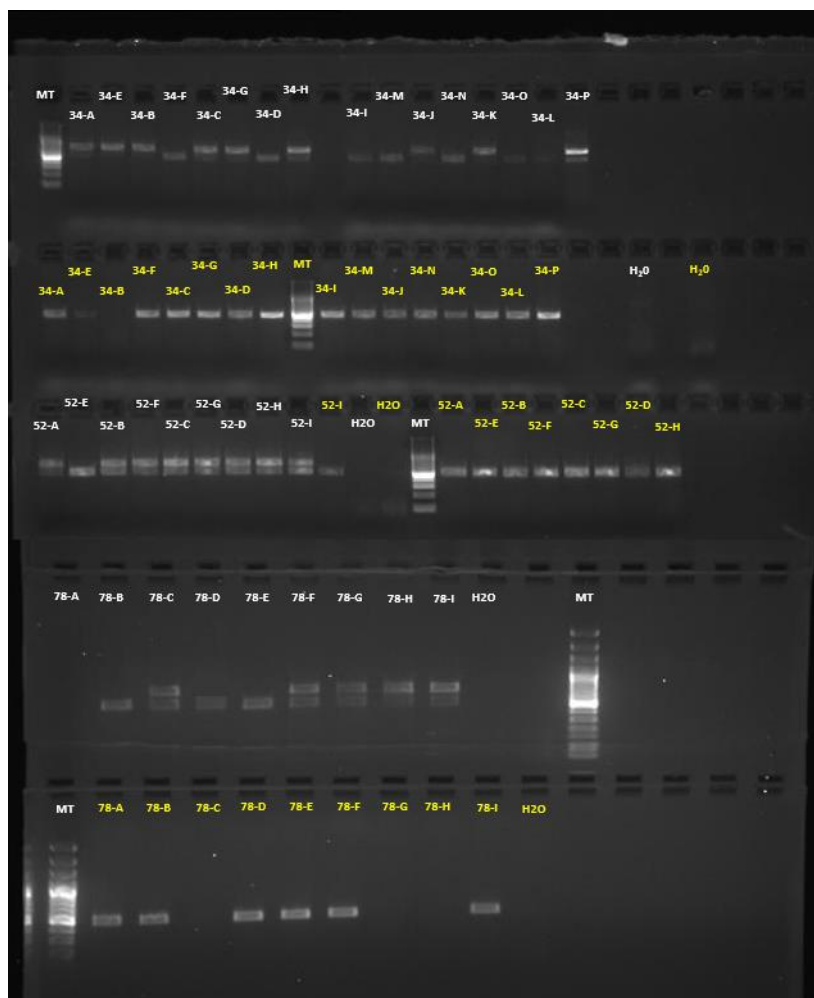


Figure F-3 : Génotypage de trois lignées d'insertion *LORE1* de *Lotus japonicus* mutées dans le gène *Lj1g3v2391210* orthologue de *Medtr7g070480*.

34 : Lignée 30073834 ; 52 : Lignée 30005652 ; 78 : Lignée 30106478. Le nom des échantillons ayant été amplifiés avec les amorces gène-spécifiques sont en blanc, ceux amplifiés avec l'amorce P2 spécifique au rétrotransposon *LORE1* et l'amorce sens gène-spécifique sont en jaune. MT : Marqueur de taille 1 kb.

Deux produits PCR sont amplifiés avec les amorces gène-spécifiques: le premier d'une taille de 696bp correspond bien au gène *Lj1g3v2391210*. La mise en ligne de nouvelles données dans la « Lotus Base » début 2016 nous a permis d'identifier le second produit PCR. D'une taille de 505bp, il correspond au gène *Lj0g3v0140459*.

G. BIBLIOGRAPHIE

- Ababouch L, Chaibi A, Busta FF.** 1992. Inhibition of Bacterial Spore Growth by Fatty Acids and Their Sodium Salts. *Journal of Food Protection* **55**, 980–984.
- Abdelguerfi A, Chapot J, Conesa A, Roseau R.** 1988. Contribution a l'étude des especes spontanees du genre *Médicago* L. en algerie. Répartition des especes en fonction des facteurs du milieu. *Annales de l'Institut national agronomique-El Harrach (Alger)* **12**, 304–328.
- Adrain C, Freeman M.** 2012. New lives for old: evolution of pseudoenzyme function illustrated by iRhoms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **13**, 489–498.
- Agrawal A, Laforsch C, Tollrian R.** 1999. Transgenerational induction of defences in animals and plants. *Nature* **401**, 61–63.
- Agrios GN.** 1988. *Plant pathology*. San Diego: Academic Press.
- Ahmad S, Veyrat N, Gordon-Weeks R, Zhang Y, Martin J, Smart L, Glauser G, Erb M, Flors V, Frey M, Ton J.** 2011. Benzoxazinoid Metabolites Regulate Innate Immunity against Aphids and Fungi in Maize. *Plant Physiology* **157**, 317–327.
- Al-Attala MN, Wang X, Abou-Attia MA, Duan X, Kang Z.** 2014. A novel *TaMYB4* transcription factor involved in the defence response against *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* and abiotic stresses. *Plant Molecular Biology* **84**, 589–603.
- Albert I, Böhm H, Albert M, Feiler CE, Imkampe J, Wallmeroth N, Brancato C, Raaymakers TM, Oome S, Zhang H, Krol E, Grefen C, Gust AA, Chai J, Hedrich R, Van den Ackerveken G, Nürnberger T.** 2015. An RLP23–SOBIR1–BAK1 complex mediates NLP-triggered immunity. *Nature Plants* **1**, 15140.
- Alexander H, Holt RD.** 1998. The interaction between plant competition and disease. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **1**, 206–220.
- Allen RL, Bittner-Eddy PD, Grenville-Briggs LJ, Meitz JC, Rehmany AP, Rose LE, Beynon JL.** 2004. Host-Parasite Coevolutionary Conflict Between Arabidopsis and Downy Mildew. *Science* **306**, 1957–1960.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**, 3389–3402.
- Ameline-Torregrosa C, Cazaux M, Danesh D, Chardon F, Cannon SB, Esquerré-Tugayé M-T, Dumas B, Young ND, Samac DA, Huguet T, Jacquet C.** 2008. Genetic Dissection of Resistance to Anthracnose and Powdery Mildew in *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**, 61–69.
- An G, Ebert PR, Yi B-Y, Choi C-H.** 1986. Both TATA box and upstream regions are required for the nopaline synthase promoter activity in transformed tobacco cells. *MGG Molecular & General Genetics* **203**, 245–250.
- Anand A, Zhou T, Trick HN, Gill BS, Bockus WW, Muthukrishnan S.** 2003. Greenhouse and field testing of transgenic wheat plants stably expressing genes for thaumatin-like protein, chitinase and glucanase against *Fusarium graminearum*. *Journal of Experimental Botany* **54**, 1101–1111.
- Anderson JC, Bartels S, Besteiro MAG, Shahollari B, Ulm R, Peck SC.** 2011. Arabidopsis MAP Kinase Phosphatase 1 (AtMKP1) negatively regulates MPK6-mediated PAMP responses and resistance against bacteria. *The Plant Journal* **67**, 258–268.

- Anderson JP, Lichtenzveig J, Gleason C, Oliver RP, Singh KB.** 2010. The B-3 ethylene response factor MtERF1-1 mediates resistance to a subset of root pathogens in *Medicago truncatula* without adversely affecting symbiosis with rhizobia. *Plant Physiology*.
- Anderson JP, Lichtenzveig J, Oliver RP, Singh KB.** 2013. *Medicago truncatula* as a model host for studying legume infecting *Rhizoctonia solani* and identification of a locus affecting resistance to root canker. *Plant Pathology* **62**, 908–921.
- Andreasson E, Jenkins T, Brodersen P, Thorgrimsen S, Petersen NHT, Zhu S, Qiu J-L, Micheelsen P, Rocher A, Petersen M, Newman M-A, Bjørn Nielsen H, Hirt H, Somssich I, Mattsson O, Mundy J.** 2005. The MAP kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses. *The EMBO Journal* **24**, 2579–2589.
- Andrivon D, Pilet F, Montarry J, Hafidi M, Corbière R, Achbani EH, Pellé R, Ellissèche D.** 2007. Adaptation of *Phytophthora infestans* to Partial Resistance in Potato: Evidence from French and Moroccan Populations. *Phytopathology* **97**, 338–343.
- Angelopoulou DJ, Naska EJ, Paplomatas EJ, Tjamos SE.** 2014. Biological control agents (BCAs) of verticillium wilt: influence of application rates and delivery method on plant protection, triggering of host defence mechanisms and rhizosphere populations of BCAs. *Plant Pathology* **63**, 1062–1069.
- Annicchiarico P, Barrett B, Brummer EC, Julier B, Marshall AH.** 2015. Achievements and Challenges in Improving Temperate Perennial Forage Legumes. *Critical Reviews in Plant Sciences* **34**, 327–380.
- Antonopoulos DF, Tjamos SE, Antoniou PP, Rafeletos P, Tjamos EC.** 2008. Effect of *Paenibacillus alvei*, strain K165, on the germination of *Verticillium dahliae* microsclerotia in planta. *Biological Control* **46**, 166–170.
- Antony G, Zhou J, Huang S, Li T, Liu B, White F, Yang B.** 2010. Rice *xa13* Recessive Resistance to Bacterial Blight Is Defeated by Induction of the Disease Susceptibility Gene *Os-11N3*. *The Plant Cell* **22**, 3864.
- Ariel F, Diet A, Verdenaud M, Gruber V, Frugier F, Chan R, Crespi M.** 2010. Environmental Regulation of Lateral Root Emergence in *Medicago truncatula* Requires the HD-Zip I Transcription Factor HB1. *THE PLANT CELL ONLINE* **22**, 2171–2183.
- Arraouadi S, Chardon F, Huguet T, Aouani ME, Badri M.** 2011a. QTLs mapping of morphological traits related to salt tolerance in *Medicago truncatula*. *Acta Physiologiae Plantarum* **33**, 917–926.
- Arraouadi S, Badri M, Taamalli W, Huguet T, Elarbi Aoua M.** 2011b. Variability salt stress response analysis of Tunisian natural populations of *Medicago truncatula* (Fabaceae) using salt response index (SRI) ratio. *African Journal of Biotechnology* **10**, 10636–10647.
- Arraouadi S, Badri M, Abdelly C, Huguet T, Aouani ME.** 2012. QTL mapping of physiological traits associated with salt tolerance in *Medicago truncatula* Recombinant Inbred Lines. *Genomics* **99**, 118–125.
- Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu W-L, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J.** 2002. MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* **415**, 977–983.
- Asano M, Satoh R, Mochizuki A, Tsuda S, Yamanaka T, Nishiguchi M, Hirai K, Meshi T, Naito S, Ishikawa M.** 2005. Tobamovirus-resistant tobacco generated by RNA interference directed against host genes. *FEBS Letters* **579**, 4479–4484.

- Asimit J, Zeggini E.** 2010. Rare Variant Association Analysis Methods for Complex Traits. *Annual Review of Genetics* **44**, 293–308.
- Assaad FF.** 2004. The PEN1 Syntaxin Defines a Novel Cellular Compartment upon Fungal Attack and Is Required for the Timely Assembly of Papillae. *Molecular Biology of the Cell* **15**, 5118–5129.
- Atwell S, Huang YS, Vilhjálmsson BJ, Willems G, Horton M, Li Y, et al.** 2010. Genome-wide association study of 107 phenotypes in *Arabidopsis thaliana* inbred lines. *Nature* **465**, 627–631.
- Avia K, Pilet-Nayel M-L, Bahrman N, Baranger A, Delbreil B, Fontaine V, Hamon C, Hanocq E, Niarquin M, Sellier H, Vuylsteker C, Prosperi J-M, Lejeune-Hénaut I.** 2013. Genetic variability and QTL mapping of freezing tolerance and related traits in *Medicago truncatula*. *Theoretical and Applied Genetics* **126**, 2353–2366.
- Axtell MJ, Staskawicz BJ.** 2003. Initiation of RPS2-specified disease resistance in *Arabidopsis* is coupled to the AvrRpt2-directed elimination of RIN4. *Cell* **112**, 369–377.
- Ayliffe M, Singh R, Lagudah E.** 2008. Durable resistance to wheat stem rust needed. *Current Opinion in Plant Biology* **11**, 187–192.
- Badet T, Voisin D, Mbengue M, Barascud M, Sucher J, Sadon P, Balagué C, Roby D, Raffaele S.** 2017. Parallel evolution of the POQR prolyl oligo peptidase gene conferring plant quantitative disease resistance. *PLOS Genetics* **13**, e1007143.
- Badis Y, Bonhomme M, Lafitte C, Huguet S, Balergue S, Dumas B, Jacquet C.** 2015. Transcriptome analysis highlights preformed defences and signalling pathways controlled by the prAe1 quantitative trait locus (QTL), conferring partial resistance to *Aphanomyces euteiches* in *Medicago truncatula*. *Molecular Plant Pathology* **16**, 973–986.
- Badri M, Ilahi H, Huguet T, Aouani ME.** 2007. Quantitative and molecular genetic variation in sympatric populations of *Medicago laciniata* and *M. truncatula* (Fabaceae): relationships with eco-geographical factors. *Genetical Research* **89**, 107.
- Badri M, Chardon F, Huguet T, Aouani ME.** 2011. Quantitative trait loci associated with drought tolerance in the model legume *Medicago truncatula*. *Euphytica* **181**, 415.
- Badri M, Bouhaouel I, Arraouadi S, Taamalli W, Huguet T, Aouani ME.** 2016. Variation in tolerance to drought among Tunisian populations of *Medicago truncatula*. *Plant Genetic Resources* **14**, 41–49.
- Baetz U, Martinoia E.** 2014. Root exudates: the hidden part of plant defense. *Trends in Plant Science* **19**, 90–98.
- Bai S, Liu J, Chang C, Zhang L, Maekawa T, Wang Q, Xiao W, Liu Y, Chai J, Takken FLW, Schulze-Lefert P, Shen Q-H.** 2012. Structure-Function Analysis of Barley NLR Immune Receptor MLA10 Reveals Its Cell Compartment Specific Activity in Cell Death and Disease Resistance. *PLOS Pathogens* **8**, e1002752.
- Bai Y, Pavan S, Zheng Z, Zappel NF, Reinstädler A, Lotti C, De Giovanni C, Ricciardi L, Lindhout P, Visser R, Theres K, Panstruga R.** 2008. Naturally Occurring Broad-Spectrum Powdery Mildew Resistance in a Central American Tomato Accession Is Caused by Loss of *Mlo* Function. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**, 30–39.
- Balmer A, Pastor V, Gamir J, Flors V, Mauch-Mani B.** 2015. The ‘prime-ome’: towards a holistic approach to priming. *Trends in Plant Science* **20**, 443–452.

- Barbary A, Palloix A, Fazari A, Marteu N, Castagnone-Sereno P, Djian-Caporalino C.** 2014. The plant genetic background affects the efficiency of the pepper major nematode resistance genes Me1 and Me3. *Theoretical and Applied Genetics* **127**, 499–507.
- Barbetti MJ.** 2007. Resistance in Annual *Medicago* spp. to *Phoma medicaginis* and *Leptosphaerulina trifolii* and Its Relationship to Induced Production of a Phytoestrogen. *Plant Disease* **91**, 239–244.
- Baron E, Richirt J, Villoutreix R, Amsellem L, Roux F.** 2015. The genetics of intra- and interspecific competitive response and effect in a local population of an annual plant species. *Functional Ecology* **29**, 1361–1370.
- Bartels S, Anderson JC, González Besteiro MA, Carreri A, Hirt H, Buchala A, Métraux J-P, Peck SC, Ulm R.** 2009. MAP KINASE PHOSPHATASE1 and PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASE1 Are Repressors of Salicylic Acid Synthesis and SNC1-Mediated Responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **21**, 2884.
- Barzman M, Bàrberi P, Birch ANE, Boonekamp P, Dachbrodt-Saaydeh S, Graf B, Hommel B, Jensen JE, Kiss J, Kudsk P, Lamichhane JR, Messéan A, Moonen A-C, Ratnadass A, Ricci P, Sarah J-L, Sattin M.** 2015. Eight principles of integrated pest management. *Agronomy for Sustainable Development* **35**, 1199–1215.
- Baxter A, Mittler R, Suzuki N.** 2014. ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of Experimental Botany* **65**, 1229–1240.
- Belkhadir Y, Jaillais Y, Eppe P, Balsemao-Pires E, Dangl JL, Chory J.** 2012. Brassinosteroids modulate the efficiency of plant immune responses to microbe-associated molecular patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 297–302.
- Bellés JM, López-Gresa MP, Fayos J, Pallás V, Rodrigo I, Conejero V.** 2008. Induction of cinnamate 4-hydroxylase and phenylpropanoids in virus-infected cucumber and melon plants. *Plant Science* **174**, 524–533.
- Ben C, Toueni M, Montanari S, Tardin M-C, Fervel M, Negahi A, Saint-Pierre L, Mathieu G, Gras M-C, Noel D, Prosperi J-M, Pilet-Nayel M-L, Baranger A, Huguet T, Julier B, Rickauer M, Gentzbittel L.** 2013a. Natural diversity in the model legume *Medicago truncatula* allows identifying distinct genetic mechanisms conferring partial resistance to *Verticillium* wilt. *Journal of Experimental Botany* **64**, 317–332.
- Ben C, Debellé F, Berges H, Bellec A, Jardinaud M-F, Anson P, Huguet T, Gentzbittel L, Vailleau F.** 2013b. *MtQRRS1*, an *R*-locus required for *Medicago truncatula* quantitative resistance to *Ralstonia solanacearum*. *New Phytologist* **199**, 758–772.
- Bergelson J, Roux F.** 2010. Towards identifying genes underlying ecologically relevant traits in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Reviews Genetics* **11**, 867–879.
- Berlanger I, Powelson ML.** 2000. *Verticillium* wilt. *The Plant Health Instructor*.
- Berriri S, Garcia AV, dit Frey NF, Rozhon W, Pateyron S, Leonhardt N, Montillet J-L, Leung J, Hirt H, Colcombet J.** 2012. Constitutively Active Mitogen-Activated Protein Kinase Versions Reveal Functions of *Arabidopsis* MPK4 in Pathogen Defense Signaling. *The Plant Cell* **24**, 4281–4293.
- Bever JD, Mangan SA, Alexander HM.** 2015. Maintenance of Plant Species Diversity by Pathogens. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **46**, 305–325.
- Bingham ET, McCoy TJ.** 1979. Cultivated Alfalfa at the Diploid Level: Origin, Reproductive Stability, and Yield of Seed and Forage. *Crop Science* **19**, 97–100.

- Blom N, Sicheritz-Pontén T, Gupta R, Gammeltoft S, Brunak S.** 2004. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *PROTEOMICS* **4**, 1633–1649.
- Blount JW, Dixon RA, Paiva NL.** 1992. Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) XVI. Antifungal activity of medicarpin and its biosynthetic precursors; implications for the genetic manipulation of stress metabolites. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **41**, 333–349.
- Blümke A, Somerville SC, Voigt CA.** 2013. Transient expression of the *Arabidopsis thaliana* callose synthase PMR4 increases penetration resistance to powdery mildew in barley. *Advances in Bioscience and Biotechnology* **04**, 810–813.
- Bodmer W, Bonilla C.** 2008. Common and rare variants in multifactorial susceptibility to common diseases. *Nature Genetics* **40**, 695–701.
- Boelt B, Julier B, Karagić Đ, Hampton J.** 2015. Legume Seed Production Meeting Market Requirements and Economic Impacts. *Critical Reviews in Plant Sciences* **34**, 412–427.
- den Boer E, Pelgrom KTB, Zhang NW, Visser RGF, Niks RE, Jeuken MJW.** 2014. Effects of stacked quantitative resistances to downy mildew in lettuce do not simply add up. *Theoretical and Applied Genetics* **127**, 1805–1816.
- Böhm H, Albert I, Fan L, Reinhard A, Nürnberger T.** 2014. Immune receptor complexes at the plant cell surface. *Current Opinion in Plant Biology* **20**, 47–54.
- Boisson-Dernier A, Chabaud M, Garcia F, Bécard G, Rosenberg C, Barker DG.** 2001. *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI* **14**, 695–700.
- Boller T, Felix G.** 2009. A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annual Review of Plant Biology* **60**, 379–406.
- Bonhomme M, André O, Badis Y, Ronfort J, Burgarella C, Chantret N, Prosperi J-M, Briskine R, Mudge J, Debéllé F, Navier H, Miteul H, Hajri A, Baranger A, Tiffin P, Dumas B, Pilet-Nayel M-L, Young ND, Jacquet C.** 2013. High-density genome-wide association mapping implicates an F-box encoding gene in *Medicago truncatula* resistance to *Aphanomyces euteiches*. *New Phytologist*, **201**, 1328–1342.
- Bos JIB, Armstrong MR, Gilroy EM, Boevink PC, Hein I, Taylor RM, Zhendong T, Engelhardt S, Vetukuri RR, Harrower B, Dixelius C, Bryan G, Sadanandom A, Whisson SC, Kamoun S, Birch PRJ.** 2010. *Phytophthora infestans* effector AVR3a is essential for virulence and manipulates plant immunity by stabilizing host E3 ligase CMPG1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 9909–9914.
- Bradbury PJ, Zhang Z, Kroon DE, Casstevens TM, Ramdoss Y, Buckler ES.** 2007. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics* **23**, 2633–2635.
- Branca A, Paape TD, Zhou P, Briskine R, Farmer AD, Mudge J, Bharti AK, Woodward JE, May GD, Gentzbittel L, Ben C, Denny R, Sadowsky MJ, Ronfort J, Bataillon T, Young ND, Tiffin P.** 2011. Whole-genome nucleotide diversity, recombination, and linkage disequilibrium in the model legume *Medicago truncatula*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, E864–E870.
- Brodersen P, Petersen M, Bjørn Nielsen H, Zhu S, Newman M-A, Shokat KM, Rietz S, Parker J, Mundy J.** 2006. *Arabidopsis* MAP kinase 4 regulates salicylic acid- and jasmonic acid/ethylene-dependent responses via EDS1 and PAD4. *The Plant Journal* **47**, 532–546.

- Brummer EC, Kochert G, Bouton JH.** 1991. RFLP variation in diploid and tetraploid alfalfa. *Theoretical and Applied Genetics* **83**.
- Brun H, Chèvre A-M, Fitt BD, Powers S, Besnard A-L, Ermel M, Huteau V, Marquer B, Eber F, Renard M, Andrivon D.** 2010. Quantitative resistance increases the durability of qualitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *New Phytologist* **185**, 285–299.
- Brunner F, Rosahl S, Lee J, Rudd JJ, Geiler C, Kauppinen S, Rasmussen G, Scheel D, Nurnberger T.** 2002. Pep-13, a plant defense-inducing pathogen-associated pattern from *Phytophthora* transglutaminases. *The EMBO Journal* **21**, 6681–6688.
- Bruns E, Carson ML, May G.** 2014. The jack of all trades is master of none: a pathogen's ability to infect a greater number of host genotypes comes at a cost of delayed reproduction. *Evolution* **68**, 2453–2466.
- Brutus A, Sicilia F, Macone A, Cervone F, De Lorenzo G.** 2010. A domain swap approach reveals a role of the plant wall-associated kinase 1 (WAK1) as a receptor of oligogalacturonides. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 9452–9457.
- Burch-Smith TM.** 2006. Efficient Virus-Induced Gene Silencing in Arabidopsis. *PLANT PHYSIOLOGY* **142**, 21–27.
- Burch-Smith TM, Schiff M, Caplan JL, Tsao J, Czymbek K, Dinesh-Kumar SP.** 2007. A Novel Role for the TIR Domain in Association with Pathogen-Derived Elicitors (JL Dangl, Ed.). *PLoS Biology* **5**, e68.
- Burdon JJ, Chilvers GA.** 1982. Host Density as a Factor in Plant Disease Ecology. *Annual Review of Phytopathology* **20**, 143–166.
- van den Burg HA, Harrison SJ, Joosten MHAJ, Vervoort J, de Wit PJGM.** 2006. *Cladosporium fulvum* Avr4 Protects Fungal Cell Walls Against Hydrolysis by Plant Chitinases Accumulating During Infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**, 1420–1430.
- Busi R, Vila-Aiub MM, Beckie HJ, Gaines TA, Goggin DE, Kaundun SS, Lacoste M, Neve P, Nissen SJ, Norsworthy JK, Renton M, Shaner DL, Tranel PJ, Wright T, Yu Q, Powles SB.** 2013. Herbicide-resistant weeds: from research and knowledge to future needs. *Evolutionary Applications* **6**, 1218–1221.
- Büttner D, He SY.** 2009. Type III Protein Secretion in Plant Pathogenic Bacteria. *Plant Physiology* **150**, 1656.
- Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, Madden TL.** 2009. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* **10**, 421.
- Cannesan MA, Gangneux C, Lanoue A, Giron D, Laval K, Hawes M, Driouich A, Vitré-Gibouin M.** 2011. Association between border cell responses and localized root infection by pathogenic *Aphanomyces euteiches*. *Annals of Botany* **108**, 459–469.
- Cannesan MA, Durand C, Burel C, Gangneux C, Lerouge P, Ishii T, Laval K, Follet-Gueye M-L, Driouich A, Vitré-Gibouin M.** 2012. Effect of Arabinogalactan Proteins from the Root Caps of Pea and *Brassica napus* on *Aphanomyces euteiches* Zoospore Chemotaxis and Germination. *PLANT PHYSIOLOGY* **159**, 1658–1670.
- Caplan J, Padmanabhan M, Dinesh-Kumar SP.** 2008. Plant NB-LRR Immune Receptors: From Recognition to Transcriptional Reprogramming. *Cell Host & Microbe* **3**, 126–135.

- Carrouée B, Schneider A, Flénet F, Jeuffroy M-H, Nemecek T.** 2012. Introduction du pois protéagineux dans des rotations à base de céréales à paille et colza : impacts sur les performances économiques et environnementales. *Innovations Agronomiques* **25**, 125–142.
- Castonguay Y, Cloutier J, Bertrand A, Michaud R, Laberge S.** 2010. SRAP polymorphisms associated with superior freezing tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* spp. *sativa*). *Theoretical and Applied Genetics* **120**, 1611–1619.
- Castro BM, Moriuchi KS, Friesen ML, Badri M, Nuzhdin SV, Strauss SY, Cook DR, von Wettberg E.** 2013. Parental environments and interactions with conspecifics alter salinity tolerance of offspring in the annual *Medicago truncatula*. *Journal of Ecology* **101**, 1281–1287.
- Chabaud M, de Carvalho-Niebel F, Barker DG.** 2003. Efficient transformation of *Medicago truncatula* cv. Jemalong using the hypervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL1. *Plant Cell Reports* **22**, 46–51.
- Chabaud M, Ratet P, de Sousa Araújo S, Roldão Lopes Amaral Duque AS, Harrison M, Barker DG.** 2007. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and in vitro plant regeneration of *M. truncatula*. *Medicago truncatula* handbook. <http://www.noble.org/MedicagoHandbook/pdf/AgrobacteriumTumefaciens>.
- Chappelka AH, Grulke NE.** 2016. Disruption of the ‘disease triangle’ by chemical and physical environmental change (LJ De Kok, Ed.). *Plant Biology* **18**, 5–12.
- Chatterjee S, Almeida RPP, Lindow S.** 2008. Living in two Worlds: The Plant and Insect Lifestyles of *Xylella fastidiosa*. *Annual Review of Phytopathology* **46**, 243–271.
- Chen B, Jiang J, Zhou X.** 2007. A *TOM1* homologue is required for multiplication of Tobacco mosaic virus in *Nicotiana benthamiana*. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B* **8**, 256–259.
- Chen J, Li N, Ma X, Gupta VK, Zhang D, Li T, Dai X.** 2017. The Ectopic Overexpression of the Cotton Ve1 and Ve2-Homolog Sequences Leads to Resistance Response to *Verticillium Wilt* in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science* **8**, 844.
- Chen L, Zhang Z, Liang H, Liu H, Du L, Xu H, Xin Z.** 2008a. Overexpression of TiERF1 enhances resistance to sharp eyespot in transgenic wheat. *Journal of Experimental Botany* **59**, 4195–4204.
- Chen L, Zhang L, Yu D.** 2010a. Wounding-Induced WRKY8 Is Involved in Basal Defense in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**, 558–565.
- Chen L, Zhang L, Li D, Wang F, Yu D.** 2013. WRKY8 transcription factor functions in the TMV-cg defense response by mediating both abscisic acid and ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, E1963–E1971.
- Chen L-Q, Hou B-H, Lalonde S, Takanaga H, Hartung ML, Qu X-Q, Guo W-J, Kim J-G, Underwood W, Chaudhuri B, Chermak D, Antony G, White FF, Somerville SC, Mudgett MB, Frommer WB.** 2010b. Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* **468**, 527.
- Chen L-Q, Qu X-Q, Hou B-H, Sosso D, Osorio S, Fernie AR, Frommer WB.** 2012. Sucrose Efflux Mediated by SWEET Proteins as a Key Step for Phloem Transport. *Science* **335**, 207.
- Chen T, Kan J, Yang Y, Ling X, Chang Y, Zhang B.** 2016. A *Ve* homologous gene from *Gossypium barbadense*, *Gbvdr3*, enhances the defense response against *Verticillium dahliae*. *Plant Physiology and Biochemistry* **98**, 101–111.

- Chen Y, Chao Q, Tan G, Zhao J, Zhang M, Ji Q, Xu M.** 2008b. Identification and fine-mapping of a major QTL conferring resistance against head smut in maize. *Theoretical and Applied Genetics* **117**, 1241–1252.
- Cheng C, Shuman S.** 2000. Recombinogenic flap ligation pathway for intrinsic repair of topoisomerase IB-induced double-strand breaks. *Molecular and Cellular Biology* **20**, 8059–8068.
- Cheng X, Wang M, Lee H-K, Tadege M, Ratet P, Udvardi M, Mysore KS, Wen J.** 2014. An efficient reverse genetics platform in the model legume *Medicago truncatula*. *New Phytologist* **201**, 1065–1076.
- Cheng YT, Germain H, Wiermer M, Bi D, Xu F, Garcia AV, Wirthmueller L, Despres C, Parker JE, Zhang Y, Li X.** 2009. Nuclear Pore Complex Component MOS7/Nup88 Is Required for Innate Immunity and Nuclear Accumulation of Defense Regulators in Arabidopsis. *THE PLANT CELL ONLINE* **21**, 2503–2516.
- Chinchilla D, Bauer Z, Regenass M, Boller T, Felix G.** 2006. The *Arabidopsis* receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *The Plant Cell* **18**, 465–476.
- Choi H-K, Kim D, Uhm T, Limpens E, Lim H, Mun J-H, Kalo P, Penmetsa RV, Seres A, Kulikova O, Roe BA, Bisseling T, Kiss GB, Cook DR.** 2004. A Sequence-Based Genetic Map of *Medicago truncatula* and Comparison of Marker Colinearity with *M. sativa*. *Genetics* **166**, 1463.
- Christensen SA, Nemchenko A, Park Y-S, Borrego E, Huang P-C, Schmelz EA, Kunze S, Feussner I, Yalpani N, Meeley R, Kolomiets MV.** 2014. The Novel Monocot-Specific 9-Lipoxygenase ZmLOX12 Is Required to Mount an Effective Jasmonate-Mediated Defense Against *Fusarium verticillioides* in Maize. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **27**, 1263–1276.
- Chu Z, Fu B, Yang H, Xu C, Li Z, Sanchez A, Park YJ, Bennetzen JL, Zhang Q, Wang S.** 2006a. Targeting xa13, a recessive gene for bacterial blight resistance in rice. *Theoretical and Applied Genetics* **112**, 455–461.
- Chu Z, Yuan M, Yao J, Ge X, Yuan B, Xu C, Li X, Fu B, Li Z, Bennetzen JL, Zhang Q, Wang S.** 2006b. Promoter mutations of an essential gene for pollen development result in disease resistance in rice. *Genes & Development* **20**, 1250–1255.
- Clemente T.** 2006. *Nicotiana (Nicotiana tabaccum, Nicotiana benthamiana)*. *Agrobacterium Protocols*. New Jersey: Humana Press, 143–154.
- Coaker G, Falick A, Staskawicz B.** 2005. Activation of a Phytopathogenic Bacterial Effector Protein by a Eukaryotic Cyclophilin. *Science* **308**, 548–550.
- Colcombet J, Berriri S, Hirt H.** 2013. Constitutively active MPK4 helps to clarify its role in plant immunity. *Plant Signaling & Behavior* **8**, e22991.
- Collins NC, Thordal-Christensen H, Lipka V, Bau S, Kombrink E, Qiu J-L, Hükelhoven R, Stein M, Freialdenhoven A, Somerville SC, Schulze-Lefert P.** 2003. SNARE-protein-mediated disease resistance at the plant cell wall. *Nature* **425**, 973.
- Combier J-P, Frugier F, de Billy F, Boualem A, El-Yahyaoui F, Moreau S, Vernié T, Ott T, Gamas P, Crespi M, Niebel A.** 2006. MtHAP2-1 is a key transcriptional regulator of symbiotic nodule development regulated by microRNA169 in *Medicago truncatula*. *Genes & Development* **20**, 3084–3088.
- Consonni C, Humphry ME, Hartmann HA, Livaja M, Durner J, Westphal L, Vogel J, Lipka V, Kemmerling B, Schulze-Lefert P, Somerville SC, Panstruga R.** 2006. Conserved requirement for a plant host cell protein in powdery mildew pathogenesis. *Nature Genetics* **38**, 716.

Cook DE, Lee TG, Guo X, Melito S, Wang K, Bayless AM, Wang J, Hughes TJ, Willis DK, Clemente TE, Diers BW, Jiang J, Hudson ME, Bent AF. 2012. Copy Number Variation of Multiple Genes at Rhg1 Mediates Nematode Resistance in Soybean. *Science* **338**, 1206–1209.

Cook DR. 1999. *Medicago truncatula*--a model in the making! *Current opinion in plant biology* **2**, 301–304.

Cordeiro MA, Moriuchi KS, Fotinos TD, Miller KE, Nuzhdin SV, von Wettberg EJ, Cook DR. 2014. Population differentiation for germination and early seedling root growth traits under saline conditions in the annual legume *Medicago truncatula* (Fabaceae). *American Journal of Botany* **101**, 488–498.

Cordell HJ. 2009. Detecting gene-gene interactions that underlie human diseases. *Nature Reviews Genetics* **10**, 392–404.

Corwin JA, Kliebenstein DJ. 2017. Quantitative Resistance: More than just perception of a pathogen. *The Plant Cell*, tpc.00915.2016.

Cosson P, Sofer L, Hien Le Q, Leger V, Schurdi-Levraud V, Whitham SA, Yamamoto ML, Gopalan S, Le Gall O, Candresse T, Carrington JC, Revers F. 2010. RTM3, Which Controls Long-Distance Movement of Potyviruses, Is a Member of a New Plant Gene Family Encoding a Meprin and TRAF Homology Domain-Containing Protein. *PLANT PHYSIOLOGY* **154**, 222–232.

Cramer H-H. 1967. Plant protection and world crop production. *Plant protection and world crop production*.

Crane C, Wright E, Dixon RA, Wang Z-Y. 2006. Transgenic *Medicago truncatula* plants obtained from *Agrobacterium tumefaciens* -transformed roots and *Agrobacterium rhizogenes*-transformed hairy roots. *Planta* **223**, 1344–1354.

Crawford EJ. 1970. Variability in a large Mediterranean collection of introduced lines of *Medicago truncatula* Gaertn. 188–92.

Crawford EJ, Lake AWH, Boyce KG. 1989. Breeding Annual *Medicago* Species for Semiarid Conditions in Southern Australia. *Advances in Agronomy*. Elsevier, 399–437.

Cui H, Tsuda K, Parker JE. 2015. Effector-Triggered Immunity: From Pathogen Perception to Robust Defense. *Annual Review of Plant Biology* **66**, 487–511.

Curtin SJ, Tiffin P, Guhlin J, Trujillo DI, Burghardt LT, Atkins P, Baltes NJ, Denny R, Voytas DF, Stupar RM, Young ND. 2017. Validating Genome-Wide Association Candidates Controlling Quantitative Variation in Nodulation. *Plant Physiology* **173**, 921–931.

Dai X, Zhao PX. 2011. psRNATarget: a plant small RNA target analysis server. *Nucleic Acids Research* **39**, W155–W159.

De Coninck B, Timmermans P, Vos C, Cammue BPA, Kazan K. 2015. What lies beneath: belowground defense strategies in plants. *Trends in Plant Science* **20**, 91–101.

De Mendiburu F. 2014. Agricolae: statistical procedures for agricultural research. R package version **1**, 1–6.

Debieu M, Huard-Chauveau C, Genissel A, Roux F, Roby D. 2016. Quantitative disease resistance to the bacterial pathogen *Xanthomonas campestris* involves an *Arabidopsis* immune receptor pair and a gene of unknown function: The genetic bases of QDR to black rot. *Molecular Plant Pathology* **17**, 510–520.

- Deketelaere S, Tyvaert L, França SC, Höfte M.** 2017. Desirable Traits of a Good Biocontrol Agent against Verticillium Wilt. *Frontiers in Microbiology* **8**, 1186.
- Demir S, şEnsoy S, Ocak E, TüFenkçi Ş, Demire Durak E, Erdinç Ç, ünSal H.** 2015. Effects of arbuscular mycorrhizal fungus, humic acid, and whey on wilt disease caused by *Verticillium dahliae* Kleb. in three solanaceous crops. *TURKISH JOURNAL OF AGRICULTURE AND FORESTRY* **39**, 300–309.
- Deng Z, Zhang X, Tang W, Osés-Prieto JA, Suzuki N, Gendron JM, Chen H, Guan S, Chalkley RJ, Peterman TK, Burlingame AL, Wang Z-Y.** 2007. A Proteomic Study of Brassinosteroid Response in *Arabidopsis*. *Molecular & cellular proteomics* : MCP **6**, 2058–2071.
- Desclos-Theveniau M, Arnaud D, Huang T-Y, Lin GJ-C, Chen W-Y, Lin Y-C, Zimmerli L.** 2012. The *Arabidopsis* Lectin Receptor Kinase LecRK-V.5 Represses Stomatal Immunity Induced by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *PLOS Pathogens* **8**, e1002513.
- Deslandes L, Olivier J, Peeters N, Feng DX, Khounlotham M, Boucher C, Somssich I, Genin S, Marco Y.** 2003. Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 8024–8029.
- Di Pietro A, Madrid MP, Caracul Z, Delgado-Jarana J, Roncero MIG.** 2003. *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Molecular Plant Pathology* **4**, 315–325.
- Dias PMB, Brunel-Muguet S, Dürr C, Huguet T, Demilly D, Wagner M-H, Teulat-Merah B.** 2011. QTL analysis of seed germination and pre-emergence growth at extreme temperatures in *Medicago truncatula*. *TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische Und Angewandte Genetik* **122**, 429–444.
- Dickson SP, Wang K, Krantz I, Hakonarson H, Goldstein DB.** 2010. Rare Variants Create Synthetic Genome-Wide Associations (N Hastie, Ed.). *PLoS Biology* **8**, e1000294.
- Diener AC, Ausubel FM.** 2005. RESISTANCE TO FUSARIUM OXYSPORUM 1, a dominant *Arabidopsis* disease-resistance gene, is not race specific. *Genetics* **171**, 305–321.
- Diez CM, Roessler K, Gaut BS.** 2014. Epigenetics and plant genome evolution. *Genome Studies and Molecular Genetics* **18**, 1–8.
- Divon HH, Ziv C, Davydov O, Yarden O, Fluhr R.** 2006. The global nitrogen regulator, FNR1, regulates fungal nutrition-genes and fitness during *Fusarium oxysporum* pathogenesis. *Molecular Plant Pathology* **7**, 485–497.
- Djébali N, Mhadhbi H, Jacquet C, Huguet T, Aouani ME.** 2007. Involvement of Hydrogen Peroxide, Peroxidase and Superoxide Dismutase in Response of *Medicago truncatula* Lines Differing in Susceptibility to *Phoma medicaginis* Infection. *Journal of Phytopathology* **155**, 633–640.
- Djébali N, Jauneau A, Ameline-Torregrosa C, Chardon F, Jaulneau V, Mathé C, Bottin A, Cazaux M, Pilet-Nayel M-L, Baranger A, Aouani ME, Esquerré-Tugayé M-T, Dumas B, Huguet T, Jacquet C.** 2009. Partial resistance of *Medicago truncatula* to *Aphanomyces euteiches* is associated with protection of the root stele and is controlled by a major QTL rich in proteasome-related genes. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI* **22**, 1043–1055.
- Djébali N, Gaamour N, Badri M, Aouani ME.** 2010. Optimizing growth and conidia production of *Cercospora medicaginis*. *Phytopathologia Mediterranea* **49**, 267–272.

- Djébali N, Aribi S, Taamalli W, Arraouadi S, Aouani ME, Badri M.** 2013. Natural variation of *Medicago truncatula* resistance to *Aphanomyces euteiches*. *European Journal of Plant Pathology* **135**, 831–843.
- Dodds PN, Lawrence GJ, Catanzariti A-M, Teh T, Wang C-IA, Ayliffe MA, Kobe B, Ellis JG.** 2006. Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 8888–8893.
- Dong N, Liu X, Lu Y, Du L, Xu H, Liu H, Xin Z, Zhang Z.** 2010. Overexpression of TaPIEP1, a pathogen-induced ERF gene of wheat, confers host-enhanced resistance to fungal pathogen *Bipolaris sorokiniana*. *Functional & Integrative Genomics* **10**, 215–226.
- Dracatos PM, van der Weerden NL, Carroll KT, Johnson ED, Plummer KM, Anderson MA.** 2014. Inhibition of cereal rust fungi by both class I and II defensins derived from the flowers of *Nicotiana glauca*: Plant defensins inhibit cereal rust pathogens. *Molecular Plant Pathology* **15**, 67–79.
- Dray S, Dufour A-B.** 2007. The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of statistical software* **22**, 1–20.
- Du Y, Mpina MH, Birch PRJ, Bouwmeester K, Govers F.** 2015. *Phytophthora infestans* RXLR effector AVR1 interacts with exocyst component Sec5 to manipulate plant immunity. *Plant Physiology* **169**, 1975–1990.
- Duan X, Zhang Z, Wang J, Zuo K.** 2016. Characterization of a Novel Cotton Subtilase Gene GbSBT1 in Response to Extracellular Stimulations and Its Role in Verticillium Resistance (X Zhang, Ed.). *PLOS ONE* **11**, e0153988.
- Duke SO, Powles SB.** 2008. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science* **64**, 319–325.
- Eckardt NA.** 2002. Plant Disease Susceptibility Genes? *The Plant Cell* **14**, 1983.
- Eichmann R, Schäfer P.** 2012. The endoplasmic reticulum in plant immunity and cell death. *Frontiers in Plant Science* **3**, 200.
- Eitas TK, Nimchuk ZL, Dangl JL.** 2008. *Arabidopsis* TAO1 is a TIR-NB-LRR protein that contributes to disease resistance induced by the *Pseudomonas syringae* effector AvrB. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 6475–6480.
- Ellis C, Turner JG.** 2001. The *Arabidopsis* Mutant *cev1* Has Constitutively Active Jasmonate and Ethylene Signal Pathways and Enhanced Resistance to Pathogens. *The Plant Cell* **13**, 1025.
- Ellis C, Karafyllidis I, Wasternack C, Turner JG.** 2002. The *Arabidopsis* Mutant *cev1* Links Cell Wall Signaling to Jasmonate and Ethylene Responses. *The Plant Cell* **14**, 1557.
- Ellwood SR, D'Souza NK, Kamphuis LG, Burgess TI, Nair RM, Oliver RP.** 2006a. SSR analysis of the *Medicago truncatula* SARDI core collection reveals substantial diversity and unusual genotype dispersal throughout the Mediterranean basin. *Theoretical and Applied Genetics* **112**, 977–983.
- Ellwood SR, Kamphuis LG, Oliver RP.** 2006b. Identification of Sources of Resistance to *Phoma medicaginis* Isolates in *Medicago truncatula* SARDI Core Collection Accessions, and Multigene Differentiation of Isolates. *Phytopathology* **96**, 1330–1336.

- Engelhardt S, Lee J, Gäbler Y, Kemmerling B, Haapalainen M-L, Li C-M, Wei Z, Keller H, Joosten M, Taira S, Nürnberger T.** 2009. Separable roles of the *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* accessory protein HrpZ1 in ion-conducting pore formation and activation of plant immunity. *The Plant Journal* **57**, 706–717.
- Erbs G, Silipo A, Aslam S, De Castro C, Liparoti V, Flagiello A, Pucci P, Lanzetta R, Parrilli M, Molinaro A, Newman M-A, Cooper RM.** 2008. Peptidoglycan and Muropeptides from Pathogens *Agrobacterium* and *Xanthomonas* Elicit Plant Innate Immunity: Structure and Activity. *Chemistry & Biology* **15**, 438–448.
- Erbs G, Newman M-A.** 2012. The role of lipopolysaccharide and peptidoglycan, two glycosylated bacterial microbe-associated molecular patterns (MAMPs), in plant innate immunity: Glycosylated bacterial MAMPs. *Molecular Plant Pathology* **13**, 95–104.
- d'Erfurth I, Cosson V, Eschstruth A, Lucas H, Kondorosi A, Ratet P.** 2003. Efficient transposition of the *Tnt1* tobacco retrotransposon in the model legume *Medicago truncatula*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **34**, 95–106.
- Eynck C, Koopmann B, Karlovsky P, von Tiedemann A.** 2009. Internal Resistance in Winter Oilseed Rape Inhibits Systemic Spread of the Vascular Pathogen *Verticillium longisporum*. *Phytopathology* **99**, 802–811.
- Felix G, Boller T.** 2003. Molecular Sensing of Bacteria in Plants: The Highly Conserved RNA-Binding Motif RNP-1 Of Bacterial Cold Shock Proteins Is Recognized As An Elicitor Signal In Tobacco. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 6201–6208.
- Feng F, Yang F, Rong W, Wu X, Zhang J, Chen S, He C, Zhou J-M.** 2012. A *Xanthomonas* uridine 5'-monophosphate transferase inhibits plant immune kinases. *Nature* **485**, 114–118.
- Filippone M., Diaz Ricci J, Mamaní de Marchese A, Farías R., Castagnaro A.** 1999. Isolation and purification of a 316 Da preformed compound from strawberry (*Fragaria ananassa*) leaves active against plant pathogens. *FEBS Letters* **459**, 115–118.
- Finn RD, Attwood TK, Babbitt PC, Bateman A, Bork P, Bridge AJ, et al.** 2017. InterPro in 2017—beyond protein family and domain annotations. *Nucleic Acids Research* **45**, D190–D199.
- Fisher MC, Henk DA, Briggs CJ, Brownstein JS, Madoff LC, McCraw SL, Gurr SJ.** 2012. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* **484**, 186–194.
- Flint J, Mackay TFC.** 2009. Genetic architecture of quantitative traits in mice, flies, and humans. *Genome Research* **19**, 723–733.
- Flint-Garcia SA, Thornsberry JM, Buckler ES.** 2003. Structure of Linkage Disequilibrium in Plants. *Annual Review of Plant Biology* **54**, 357–374.
- Flood PJ, Hancock AM.** 2017. The genomic basis of adaptation in plants. 36 *Genome studies and molecular genetics* **36**, 88–94.
- Fondevilla S, Chattopadhyay C, Khare N, Rubiales D.** 2013. Erysiphe trifolii is able to overcome er1 and Er3, but not er2, resistance genes in pea. *European Journal of Plant Pathology* **136**, 557–563.
- Foroozanfar M, Exbrayat S, Bertoni G, Naghavi MR, Peyghambari A, Badri M, Debelle F.** 2014. Genetic variability and identification of quantitative trait loci affecting plant growth and chlorophyll fluorescence parameters in the model legume *Medicago truncatula* under control and salt stress conditions. *Functional Plant Biology* **41**, 983–1001.

- Forsyth A, Mansfield JW, Grabov N, de Torres M, Sinapidou E, Grant MR.** 2010. Genetic Dissection of Basal Resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in Accessions of *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**, 1545–1552.
- Fradin EF, Thomma BPHJ.** 2006. Physiology and molecular aspects of Verticillium wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Molecular Plant Pathology* **7**, 71–86.
- Fradin EF, Zhang Z, Juarez Ayala JC, Castroverde CDM, Nazar RN, Robb J, Liu C-M, Thomma BPHJ.** 2009. Genetic Dissection of Verticillium Wilt Resistance Mediated by Tomato Ve1. *PLANT PHYSIOLOGY* **150**, 320–332.
- Fradin EF, Abd-El-Hallem A, Masini L, van den Berg GCM, Joosten MHAJ, Thomma BPHJ.** 2011. Interfamily Transfer of Tomato Ve1 Mediates *Verticillium* Resistance in *Arabidopsis*. *PLANT PHYSIOLOGY* **156**, 2255–2265.
- Freeman.** 2008. An Overview of Plant Defenses against Pathogens and Herbivores. The Plant Health Instructor.
- Freisleben R, Lein A.** 1942. Über die Auffindung einer mehlttauresistenten Mutante nach Röntgenbestrahlung einer anfälligen reinen Linie von Sommergerste. *Naturwissenschaften* **30**, 608–608.
- French E, Kim B-S, Iyer-Pascuzzi AS.** 2016. Mechanisms of quantitative disease resistance in plants. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **56**, 201–208.
- Friesen ML, Cordeiro MA, Penmetsa RV, Badri M, Huguet T, Aouani ME, Cook DR, Nuzhdin SV.** 2010. Population genomic analysis of Tunisian *Medicago truncatula* reveals candidates for local adaptation. *The Plant Journal* **63**, 623–635.
- Friesen ML, von Wettberg EJ, Badri M, Moriuchi KS, Barhoumi F, Chang PL, Cuellar-Ortiz S, Cordeiro MA, Vu WT, Arraouadi S, Djébal N, Zribi K, Badri Y, Porter SS, Aouani M, Cook DR, Strauss SY, Nuzhdin SV.** 2014. The ecological genomic basis of salinity adaptation in Tunisian *Medicago truncatula*. *BMC Genomics* **15**, 1160.
- Fu D, Uauy C, Distelfeld A, Blechl A, Epstein L, Chen X, Sela H, Fahima T, Dubcovsky J.** 2009. A Kinase-START Gene Confers Temperature-Dependent Resistance to Wheat Stripe Rust. *Science* **323**, 1357–1360.
- Fu Y, Duan X, Tang C, Li X, Voegelé RT, Wang X, Wei G, Kang Z.** 2014. TaADF7, an actin-depolymerizing factor, contributes to wheat resistance against *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *The Plant Journal* **78**, 16–30.
- Fu ZQ, Guo M, Jeong B, Tian F, Elthon TE, Cerny RL, Staiger D, Alfano JR.** 2007. A type III effector ADP-ribosylates RNA-binding proteins and quells plant immunity. *Nature* **447**, 284–288.
- Fukai E, Dobrowolska AD, Madsen LH, Madsen EB, Umehara Y, Kouchi H, Hirochika H, Stougaard J.** 2008. Transposition of a 600 thousand-year-old LTR retrotransposon in the model legume *Lotus japonicus*. *Plant Molecular Biology* **68**, 653–663.
- Fukai E, Umehara Y, Sato S, Endo M, Kouchi H, Hayashi M, Stougaard J, Hirochika H.** 2010. Derepression of the Plant Chromovirus *LORE1* Induces Germline Transposition in Regenerated Plants (PS Schnable, Ed.). *PLoS Genetics* **6**, e1000868.

- Fukai E, Soyano T, Umehara Y, Nakayama S, Hirakawa H, Tabata S, Sato S, Hayashi M.** 2012. Establishment of a *Lotus japonicus* gene tagging population using the exon-targeting endogenous retrotransposon *LORE1*: Retrotransposon tagging in *Lotus japonicus*. *The Plant Journal* **69**, 720–730.
- Fukuoka S, Saka N, Koga H, Ono K, Shimizu T, Ebana K, Hayashi N, Takahashi A, Hirochika H, Okuno K, Yano M.** 2009. Loss of Function of a Proline-Containing Protein Confers Durable Disease Resistance in Rice. *Science* **325**, 998–1001.
- Fukuoka S, Saka N, Mizukami Y, Koga H, Yamanouchi U, Yoshioka Y, Hayashi N, Ebana K, Mizobuchi R, Yano M.** 2015a. Gene pyramiding enhances durable blast disease resistance in rice. *5*, 7773.
- Fukuoka S, Yamamoto S-I, Mizobuchi R, Yamanouchi U, Ono K, Kitazawa N, Yasuda N, Fujita Y, Thi Thanh Nguyen T, Koizumi S, Sugimoto K, Matsumoto T, Yano M.** 2015b. Multiple functional polymorphisms in a single disease resistance gene in rice enhance durable resistance to blast. *Scientific Reports* **4**.
- Gallego-Giraldo L, Jikumaru Y, Kamiya Y, Tang Y, Dixon RA.** 2011. Selective lignin downregulation leads to constitutive defense response expression in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *New Phytologist* **190**, 627–639.
- Gallusci P, Dai Z, Génard M, Gauffretau A, Leblanc-Fournier N, Richard-Molard C, Vile D, Brunel-Muguet S.** 2017. Epigenetics for Plant Improvement: Current Knowledge and Modeling Avenues. *Trends in Plant Science* **22**, 610–623.
- Gao L-L, Anderson JP, Klingler JP, Nair RM, Edwards OR, Singh KB.** 2007. Involvement of the Octadecanoid Pathway in Bluegreen Aphid Resistance in *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**, 82–93.
- Gao M, Liu J, Bi D, Zhang Z, Cheng F, Chen S, Zhang Y.** 2008. MEKK1, MKK1/MKK2 and MPK4 function together in a mitogen-activated protein kinase cascade to regulate innate immunity in plants. *Cell Research* **18**, 1190–1198.
- Gao Z, Chung E-H, Eitas TK, Dangl JL.** 2011. Plant intracellular innate immune receptor Resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* 1 (RPM1) is activated at, and functions on, the plasma membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 7619–7624.
- Garmier M, Gentzbittel L, Wen J, Mysore KS, Ratet P.** 2017. *Medicago truncatula*: Genetic and Genomic Resources. *Current Protocols in Plant Biology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 318–349.
- Gassmann W, Hinsch ME, Staskawicz BJ.** 1999. The *Arabidopsis* RPS4 bacterial-resistance gene is a member of the TIR-NBS-LRR family of disease-resistance genes. *The Plant Journal* **20**, 265–277.
- Gaulin E, Drame N, Lafitte C, Torto-Alalibo T, Martinez Y, Ameline-Torregrosa C, Khatib M, Mazarguil H, Villalba-Mateos F, Kamoun S, Mazars C, Dumas B, Bottin A, Esquerré-Tugayé M-T, Rickauer M.** 2006. Cellulose Binding Domains of a *Phytophthora* Cell Wall Protein Are Novel Pathogen-Associated Molecular Patterns. *THE PLANT CELL ONLINE* **18**, 1766–1777.
- Geng S, Li A, Tang L, Yin L, Wu L, Lei C, Guo X, Zhang X, Jiang G, Zhai W, Wei Y, Zheng Y, Lan X, Mao L.** 2013. TaCPK2-A, a calcium-dependent protein kinase gene that is required for wheat powdery mildew resistance enhances bacterial blight resistance in transgenic rice. *Journal of Experimental Botany* **64**, 3125–3136.

- Genin S.** 2010. Molecular traits controlling host range and adaptation to plants in *Ralstonia solanacearum*: Research review. *New Phytologist* **187**, 920–928.
- Gentzbittel L, Ben C, Mazurier M, Shin M-G, Lorenz T, Rickauer M, Majoram P, Nuzhdin SV, Tatarinova TV.** soumis. Genome admixture components accurately predict quantitative functional traits in plants. *Genome Biology*.
- Ghalambor CK, Mckay JK, Carroll SP, Reznick DN.** 2007. Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. *Functional Ecology* **21**, 394–407.
- Ghosh R, Bankaitis VA.** 2011. Phosphatidylinositol transfer proteins: Negotiating the regulatory interface between lipid metabolism and lipid signaling in diverse cellular processes. *BioFactors* **37**, 290–308.
- Giberti S, Berteaux CM, Narayana R, Maffei ME, Forlani G.** 2012. Two phenylalanine ammonia lyase isoforms are involved in the elicitor-induced response of rice to the fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*. *Journal of Plant Physiology* **169**, 249–254.
- Gibson G.** 2012. Rare and common variants: twenty arguments. *Nature Reviews Genetics* **13**, 135–145.
- Gilbert GS.** 2002. Evolutionary Ecology of Plant Diseases in Natural Ecosystems. *Annual Review of Phytopathology* **40**, 13–43.
- Gilligan CA.** 1990. Comparison of disease progress curves. *New Phytologist* **115**, 223–242.
- Göhre V, Spallek T, Häweker H, Mersmann S, Mentzel T, Boller T, de Torres M, Mansfield JW, Robatzek S.** 2008. Plant Pattern-Recognition Receptor FLS2 Is Directed for Degradation by the Bacterial Ubiquitin Ligase AvrPtoB. *Current Biology* **18**, 1824–1832.
- Göhre V, Jones AME, Sklenář J, Robatzek S, Weber APM.** 2012. Molecular Crosstalk Between PAMP-Triggered Immunity and Photosynthesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **25**, 1083–1092.
- Gómez-Gómez L, Bauer Z, Boller T.** 2001. Both the Extracellular Leucine-Rich Repeat Domain and the Kinase Activity of FLS2 Are Required for Flagellin Binding and Signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **13**, 1155.
- Gong Q, Yang Z, Wang X, Butt HI, Chen E, He S, Zhang C, Zhang X, Li F.** 2017. Salicylic acid-related cotton (*Gossypium arboreum*) ribosomal protein GaRPL18 contributes to resistance to *Verticillium dahliae*. *BMC Plant Biology* **17**, 59.
- Gonzalez CI, Martin CE.** 1996. Fatty Acid-responsive Control of mRNA Stability: UNSATURATED FATTY ACID-INDUCED DEGRADATION OF THE SACCHAROMYCES OLE1 TRANSCRIPT. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 25801–25809.
- Gorton AJ, Heath KD, Pilet-Nayel M-L, Baranger A, Stinchcombe JR.** 2012. Mapping the Genetic Basis of Symbiotic Variation in Legume-Rhizobium Interactions in *Medicago truncatula*. *G3: Genes | Genomes | Genetics* **2**, 1291–1303.
- Granado J, Felix G, Boller T.** 1995. Perception of Fungal Sterols in Plants (Subnanomolar Concentrations of Ergosterol Elicit Extracellular Alkalinization in Tomato Cells). *Plant Physiology* **107**, 485–490.
- Gu Y, Innes RW.** 2012. The KEEP ON GOING Protein of *Arabidopsis* Regulates Intracellular Protein Trafficking and Is Degraded during Fungal Infection. *The Plant Cell* **24**, 4717–4730.

- Gu Z, Liu T, Ding B, Li F, Wang Q, Qian S, Ye F, Chen T, Yang Y, Wang J, Wang G, Zhang B, Zhou X.** 2017. Two Lysin-Motif Receptor Kinases, Gh-LYK1 and Gh-LYK2, Contribute to Resistance against Verticillium wilt in Upland Cotton. *Frontiers in Plant Science* **8**, 2133.
- Guillon S, Trémouillaux-Guiller J, Pati PK, Rideau M, Gantet P.** 2006. Hairy root research: recent scenario and exciting prospects. *Physiology and metabolism* / edited by Eran Pichersky and Krishna Niyogi **9**, 341–346.
- Gundry RL, White MY, Murray CI, Kane LA, Fu Q, Stanley BA, Van Eyk JE.** 2009. Preparation of Proteins and Peptides for Mass Spectrometry Analysis in a Bottom-Up Proteomics Workflow. *Current protocols in molecular biology* / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.] **CHAPTER**, Unit10.25-Unit10.25.
- Gunnaiah R, Kushalappa AC, Duggavathi R, Fox S, Somers DJ.** 2012. Integrated Metabolo-Proteomic Approach to Decipher the Mechanisms by Which Wheat QTL (Fhb1) Contributes to Resistance against *Fusarium graminearum* (Y-W Lee, Ed.). *PLoS ONE* **7**, e40695.
- Guo S-M, Kamphuis LG, Gao L-L, Klingler JP, Lichtenzveig J, Edwards O, Singh KB.** 2012. Identification of distinct quantitative trait loci associated with defence against the closely related aphids *Acyrtosiphon pisum* and *A. kondoi* in *Medicago truncatula*. *Journal of Experimental Botany* **63**, 3913–3922.
- Guo W, Jin L, Miao Y, He X, Hu Q, Guo K, Zhu L, Zhang X.** 2016. An ethylene response-related factor, *GbERF1*-like, from *Gossypium barbadense* improves resistance to *Verticillium dahliae* via activating lignin synthesis. *Plant Molecular Biology* **91**, 305–318.
- Gururani MA, Venkatesh J, Upadhyaya CP, Nookaraju A, Pandey SK, Park SW.** 2012. Plant disease resistance genes: Current status and future directions. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **78**, 51–65.
- Hadley W.** 2016. *Ggplot2*. New York, NY: Springer Science+Business Media, LLC.
- Häffner E, Karlovsky P, Diederichsen E.** 2010. Genetic and environmental control of the Verticillium syndrome in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology* **10**, 235.
- Häffner E, Karlovsky P, Splivallo R, Traczewska A, Diederichsen E.** 2014. ERECTA, salicylic acid, abscisic acid, and jasmonic acid modulate quantitative disease resistance of *Arabidopsis thaliana* to *Verticillium longisporum*. *BMC Plant Biology* **14**, 85.
- Hall T.** 2005. BioEdit version 7.0.0. Department of Microbiology, North Carolina State University.
- Han J, Lakshman DK, Galvez LC, Mitra S, Baenziger PS, Mitra A.** 2012. Transgenic expression of lactoferrin imparts enhanced resistance to head blight of wheat caused by *Fusarium graminearum*. *BMC Plant Biology* **12**, 33.
- Han Y, Zhang Y, Jiang G, Sledge M, Greene S, Coyne C, Monteros M.** 2007. Evaluation of Genetic Diversity, Population Structure and Identification of a *Medicago truncatula* Core Collection using SSR Markers.
- Han Y, Motes CM, Monteros MJ.** 2010. Evaluation and Utilization of Morphological Variation in a *Medicago truncatula* Core Collection. Sustainable use of Genetic Diversity in Forage and Turf Breeding. Springer, 101–105.
- Haney CH, Long SR.** 2010. Plant flotillins are required for infection by nitrogen-fixing bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 478–483.

- Hao G, Pitino M, Duan Y, Stover E.** 2016. Reduced Susceptibility to *Xanthomonas citri* in Transgenic Citrus Expressing the FLS2 Receptor From *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **29**, 132–142.
- Hartley JL.** 2000. DNA Cloning Using In Vitro Site-Specific Recombination. *Genome Research* **10**, 1788–1795.
- Harwood TD, Tomlinson I, Potter CA, Knight JD.** 2011. Dutch elm disease revisited: past, present and future management in Great Britain. *Plant Pathology* **60**, 545–555.
- Hasegawa M, Kishino H.** 1994. Accuracies of the Simple Methods for Estimating the Bootstrap Probability of a Maximum-Likelihood Tree. *Molecular Biology and Evolution*.
- Hause B, Frugier F, Crespi M.** 2006. Immunolocalization. *Medicago truncatula* handbook. <http://www.noble.org/MedicagoHandbook/pdf/Immunolocalization>.
- Hayes RJ, McHale LK, Vallad GE, Truco MJ, Michelmore RW, Klosterman SJ, Maruthachalam K, Subbarao KV.** 2011. The inheritance of resistance to Verticillium wilt caused by race 1 isolates of *Verticillium dahliae* in the lettuce cultivar La Brillante. *Theoretical and Applied Genetics* **123**, 509–517.
- Hayslett M, Juzwik J, Moltzan B.** 2008. Three *Colopterus* Beetle Species Carry the Oak Wilt Fungus to Fresh Wounds on Red Oak in Missouri. *Plant Disease* **92**, 270–275.
- Hayward AC.** 1991. Biology and Epidemiology of Bacterial Wilt Caused by *Pseudomonas Solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology* **29**, 65–87.
- Hayward AP, Tsao J, Dinesh-Kumar SP.** 2009. Autophagy and plant innate immunity: Defense through degradation. *Systems Biology of Plant-Pathogen Interactions* **20**, 1041–1047.
- He D, Zhan J, Xie L.** 2016. Problems, challenges and future of plant disease management: from an ecological point of view. *Journal of Integrative Agriculture* **15**, 705–715.
- He J, Benedito VA, Wang M, Murray JD, Zhao PX, Tang Y, Udvardi MK.** 2009. The *Medicago truncatula* gene expression atlas web server. *BMC Bioinformatics* **10**, 441.
- Heese A, Hann DR, Gimenez-Ibanez S, Jones AME, He K, Li J, Schroeder JI, Peck SC, Rathjen JP.** 2007. The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 12217–12222.
- Heider MR, Munson M.** 2012. Exorcising the Exocyst Complex. *Traffic* **13**, 898–907.
- Heinlein M.** 2015. Plant virus replication and movement. 60th Anniversary Issue **479–480**, 657–671.
- Henderson CR.** 1984. *Applications of linear models in animal breeding*. Guelph, Ont.
- Henty-Ridilla JL, Shimono M, Li J, Chang JH, Day B, Staiger CJ.** 2013. The Plant Actin Cytoskeleton Responds to Signals from Microbe-Associated Molecular Patterns. *PLOS Pathogens* **9**, e1003290.
- Henty-Ridilla JL, Li J, Day B, Staiger CJ.** 2014. ACTIN DEPOLYMERIZING FACTOR4 Regulates Actin Dynamics during Innate Immune Signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **26**, 340.
- Hernández-Blanco C, Feng DX, Hu J, Sánchez-Vallet A, Deslandes L, Llorente F, Berrocal-Lobo M, Keller H, Barlet X, Sánchez-Rodríguez C, Anderson LK, Somerville S, Marco Y, Molina A.** 2007. Impairment of Cellulose Synthases Required for *Arabidopsis* Secondary Cell Wall Formation Enhances Disease Resistance. *The Plant Cell* **19**, 890.

- Herrmann D, Barre P, Santoni S, Julier B.** 2010. Association of a CONSTANS-LIKE gene to flowering and height in autotetraploid alfalfa. *Theoretical and Applied Genetics* **121**, 865–876.
- Hinsch M, Staskawicz B.** 1996. Identification of a new *Arabidopsis* disease resistance locus, RPs4, and cloning of the corresponding avirulence gene, avrRps4, from *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI* **9**, 55–61.
- Holah JC, Alexander HM.** 1999. Soil pathogenic fungi have the potential to affect the co-existence of two tallgrass prairie species. *Journal of Ecology* **87**, 598–608.
- Hougaard BK, Madsen LH, Sandal N, de Carvalho Moretzsohn M, Fredslund J, Schausser L, Nielsen AM, Rohde T, Sato S, Tabata S, Bertoli DJ, Stougaard J.** 2008. Legume Anchor Markers Link Syntenic Regions Between *Phaseolus vulgaris*, *Lotus japonicus*, *Medicago truncatula* and *Arachis*. *Genetics* **179**, 2299.
- Hu Y, Chen L, Wang H, Zhang L, Wang F, Yu D.** 2013. Arabidopsis transcription factor WRKY8 functions antagonistically with its interacting partner VQ9 to modulate salinity stress tolerance. *The Plant Journal* **74**, 730–745.
- Huang J, Kim CM, Xuan Y, Park SJ, Piao HL, Je BI, Liu J, Kim TH, Kim B-K, Han C-D.** 2013. OsSNDP1, a Sec14-nodulin domain-containing protein, plays a critical role in root hair elongation in rice. *Plant Molecular Biology* **82**, 39–50.
- Huang J, Ghosh R, Bankaitis VA.** 2016. Sec14-like phosphatidylinositol transfer proteins and the biological landscape of phosphoinositide signaling in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1861**, 1352–1364.
- Huard-Chauveau C, Percepied L, Debieu M, Rivas S, Kroj T, Kars I, Bergelson J, Roux F, Roby D.** 2013. An Atypical Kinase under Balancing Selection Confers Broad-Spectrum Disease Resistance in *Arabidopsis* (JM McDowell, Ed.). *PLoS Genetics* **9**, e1003766.
- Huisman OC.** 1982. Interrelations of Root Growth Dynamics to Epidemiology of Root-Invasive Fungi. *Annual Review of Phytopathology* **20**, 303–327.
- Humphry M, Consonni C, Panstruga R.** 2006. mlo-based powdery mildew immunity: silver bullet or simply non-host resistance? *Molecular Plant Pathology* **7**, 605–610.
- Humphry ME, Konduri V, Lambrides CJ, Magner T, McIntyre CL, Aitken EAB, Liu CJ.** 2002. Development of a mungbean (*Vigna radiata*) RFLP linkage map and its comparison with lablab (*Lablab purpureus*) reveals a high level of colinearity between the two genomes. *Theor Appl Genet* **105**.
- Humphry ME, Reinstädler A, Ivanov S, Bisseling T, Panstruga R.** 2011. Durable broad-spectrum powdery mildew resistance in pea er1 plants is conferred by natural loss-of-function mutations in PsMLO1. *Molecular Plant Pathology* **12**, 866–878.
- Hurni S, Scheuermann D, Krattinger SG, Kessel B, Wicker T, Herren G, Fitze MN, Breen J, Prestler T, Ouzunova M, Keller B.** 2015. The maize disease resistance gene *Htn1* against northern corn leaf blight encodes a wall-associated receptor-like kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**, 8780–8785.
- Ikeda K, Banno S, Furusawa A, Shibata S, Nakaho K, Fujimura M.** 2015. Crop rotation with broccoli suppresses Verticillium wilt of eggplant. *Journal of General Plant Pathology* **81**, 77–82.

Ilao RO, Faylon PS, Dar WD, Batchelor WD, Sayyed R, Sudini HK, Kumar KVK, Armanda AB, Gopalakrishnan S, Reddy MS. 2014. *Recent Advances in Biofertilizers and Biofungicides (PGPR) for Sustainable Agriculture*. Newcastle upon Tyne: Cambridge Scholars.

Inderbitzin P, Bostock RM, Davis RM, Usami T, Platt HW, Subbarao KV. 2011. Phylogenetics and Taxonomy of the Fungal Vascular Wilt Pathogen *Verticillium*, with the Descriptions of Five New Species (A Idnurm, Ed.). PLoS ONE **6**, e28341.

Inderbitzin P, Davis RM, Bostock RM, Subbarao KV. 2013. Identification and Differentiation of *Verticillium* Species and *V. longisporum* Lineages by Simplex and Multiplex PCR Assays (N Corradi, Ed.). PLoS ONE **8**, e65990.

Inderbitzin P, Subbarao KV. 2014. *Verticillium* Systematics and Evolution: How Confusion Impedes Verticillium Wilt Management and How to Resolve It. Phytopathology **104**, 564–574.

Isaac I, Heale JB. 1961. Wilt of lucerne caused by species of *Verticillium*: III. Viability of *V. albo-atrum* carried with lucerne seed; effects of seed dressings and fumigants. Annals of Applied Biology **49**, 675–691.

Ishihama N, Yoshioka H. 2012. Post-translational regulation of WRKY transcription factors in plant immunity. Current Opinion in Plant Biology **15**, 431–437.

Jakse J, Cerenak A, Radisek S, Satovic Z, Luthar Z, Javornik B. 2013. Identification of quantitative trait loci for resistance to Verticillium wilt and yield parameters in hop (*Humulus lupulus* L.). Theoretical and Applied Genetics **126**, 1431–1443.

Jamann TM, Luo X, Morales L, Kolkman JM, Chung C-L, Nelson RJ. 2016. A remorin gene is implicated in quantitative disease resistance in maize. Theoretical and Applied Genetics **129**, 591–602.

Jasiński M, Kachlicki P, Rodziejewicz P, Figlerowicz M, Stobiecki M. 2009. Changes in the profile of flavonoid accumulation in *Medicago truncatula* leaves during infection with fungal pathogen *Phoma medicaginis*. Plant Physiology and Biochemistry **47**, 847–853.

Jensen ON. 2006. Interpreting the protein language using proteomics. Nature Reviews Molecular Cell Biology **7**, 391–403.

Jeong B, Lin Y, Joe A, Guo M, Korneli C, Yang H, Wang P, Yu M, Cerny RL, Staiger D, Alfano JR, Xu Y. 2011. Structure Function Analysis of an ADP-ribosyltransferase Type III Effector and Its RNA-binding Target in Plant Immunity. Journal of Biological Chemistry **286**, 43272–43281.

Jeworutzki E, Roelfsema MRG, Anschütz U, Krol E, Elzenga JTM, Felix G, Boller T, Hedrich R, Becker D. 2010. Early signaling through the *Arabidopsis* pattern recognition receptors FLS2 and EFR involves Ca²⁺-associated opening of plasma membrane anion channels: Flagellin-activated ion channels. The Plant Journal **62**, 367–378.

Jha S, Tank HG, Prasad BD, Chattoo BB. 2009. Expression of Dm-AMP1 in rice confers resistance to *Magnaporthe oryzae* and *Rhizoctonia solani*. Transgenic Research **18**, 59–69.

Jia Y, McAdams SA, Bryan GT, Hershey HP, Valent B. 2000. Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. The EMBO Journal **19**, 4004–4014.

Jiménez Díaz RM, Millar RL. 1988. Sporulation on infected tissues, and presence of airborne *Verticillium albo-atrum* in alfalfa fields in New York. Plant Pathology **37**, 64–70.

- Jiwan D, Roalson EH, Main D, Dhingra A.** 2013. Antisense expression of peach mildew resistance locus O (PpMlo1) gene confers cross-species resistance to powdery mildew in *Fragaria x ananassa*. *Transgenic Research* **22**, 1119–1131.
- Johal GS, Briggs SP.** 1992. Reductase activity encoded by the *HM1* disease resistance gene in maize. *Science (New York, N.Y.)* **258**, 985–987.
- Johansson A, Staal J, Dixelius C.** 2006. Early Responses in the *Arabidopsis-Verticillium longisporum* Pathosystem Are Dependent on *NDR1*, JA- and ET-Associated Signals via Cytosolic NPR1 and *RFO1*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**, 958–969.
- Johansson ON, Nilsson AK, Gustavsson MB, Backhaus T, Andersson MX, Ellerström M.** 2015. A quick and robust method for quantification of the hypersensitive response in plants. *PeerJ* **3**, e1469.
- Johnson RC, Nelson GW, Troyer JL, Lautenberger JA, Kessing BD, Winkler CA, O'Brien SJ.** 2010. Accounting for multiple comparisons in a genome-wide association study (GWAS). *BMC Genomics* **11**, 724.
- Jones JDG, Dangl JL.** 2006. The plant immune system. *Nature* **444**, 323–329.
- de Jonge R, Peter van Esse H, Maruthachalam K, Bolton MD, Santhanam P, Saber MK, Zhang Z, Usami T, Lievens B, Subbarao KV, Thomma BPHJ.** 2012. Tomato immune receptor Ve1 recognizes effector of multiple fungal pathogens uncovered by genome and RNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 5110–5115.
- Jørgensen IH.** 1992. Discovery, characterization and exploitation of Mlo powdery mildew resistance in barley. *Euphytica* **63**, 141–152.
- Jouannic N, Lepetit M, Vergnolle C, Cantrel C, Gardies A-M, Kader J-C, Arondel V.** 1998. Isolation of a cDNA from *Arabidopsis thaliana* that complements the *sec14* mutant of yeast. *European Journal of Biochemistry* **258**, 402–410.
- Julier B, Huguet T, Chardon F, Ayadi R, Pierre J-B, Prosperi J-M, Barre P, Huyghe C.** 2007. Identification of quantitative trait loci influencing aerial morphogenesis in the model legume *Medicago truncatula*. *Theoretical and Applied Genetics* **114**, 1391–1406.
- Julier B, Meusnier I, Alaux L, Flajoulot S, Barre P, Gouzy J.** 2013. Role of the *RCT1* Gene in Anthracnose Resistance in Alfalfa. *Breeding strategies for sustainable forage and turf grass improvement*. Dordrecht: Springer Netherlands, 203–208.
- Jung YJ, Lee IH, Nou IS, Lee KD, Rashotte AM, Kang KK.** 2013. *BrRZFP1* a *Brassica rapa* C3HC4-type RING zinc finger protein involved in cold, salt and dehydration stress: *BrRZFP1* is involved in abiotic stress. *Plant Biology* **15**, 274–283.
- Kachroo A, Lapchyk L, Fukushige H, Hildebrand D, Klessig D, Kachroo P.** 2003. Plastidial Fatty Acid Signaling Modulates Salicylic Acid- and Jasmonic Acid-Mediated Defense Pathways in the *Arabidopsis ssi2* Mutant. *The Plant Cell* **15**, 2952.
- Kachroo P, Shanklin J, Shah J, Whittle EJ, Klessig DF.** 2001. A fatty acid desaturase modulates the activation of defense signaling pathways in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 9448–9453.
- Kadota Y, Sklenar J, Derbyshire P, Stransfeld L, Asai S, Ntoukakis V, Jones JD, Shirasu K, Menke F, Jones A, Zipfel C.** 2014. Direct Regulation of the NADPH Oxidase RBOHD by the PRR-Associated Kinase BIK1 during Plant Immunity. *Molecular Cell* **54**, 43–55.

- Kadri A, Julier B, Laouar M, Ben C, Badri M, Chedded J, Mouhouche B, Gentzbittel L, Abdelguerfi A.** 2017. Genetic determinism of reproductive fitness traits under drought stress in the model legume *Medicago truncatula*. *Acta Physiologiae Plantarum* **39**, 227.
- Kamphuis LG, Lichtenzweig J, Peng K, Guo S-M, Klingler JP, Siddique KHM, Gao L-L, Singh KB.** 2013. Characterization and genetic dissection of resistance to spotted alfalfa aphid (*Therioaphis trifolii*) in *Medicago truncatula*. *Journal of Experimental Botany* **64**, 5157–5172.
- Kamphuis LG, Guo S-M, Gao L-L, Singh KB.** 2016. Genetic Mapping of a Major Resistance Gene to Pea Aphid (*Acyrtosiphon pisum*) in the Model Legume *Medicago truncatula* (M Maffei, Ed.). *International Journal of Molecular Sciences* **17**, 1224.
- Kam-Thong T, Putz B, Karbalai N, Muller-Myhsok B, Borgwardt K.** 2011. Epistasis detection on quantitative phenotypes by exhaustive enumeration using GPUs. *Bioinformatics* **27**, i214–i221.
- Kang Y, Li M, Sinharoy S, Verdier J.** 2016. A Snapshot of Functional Genetic Studies in *Medicago truncatula*. *Frontiers in Plant Science* **7**, 1175.
- Kapranov P, de Bruijn FJ, Szczylowski K.** 1997. Novel, highly expressed late nodulin gene (*LjNOD16*) from *Lotus japonicus*. *Plant Physiology* **113**, 1081–1090.
- Karimi M, Inzé D, Depicker A.** 2002. GATEWAY™ vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science* **7**, 193–195.
- Katiyar-Agarwal S, Morgan R, Dahlbeck D, Borsani O, Villegas A, Zhu J-K, Staskawicz BJ, Jin H.** 2006. A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 18002–18007.
- Kawchuk LM, Hachey J, Lynch DR, Kulcsar F, van Rooijen G, Waterer DR, Robertson A, Kokko E, Byers R, Howard RJ, Fischer R, Prufer D.** 2001. Tomato Ve disease resistance genes encode cell surface-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 6511–6515.
- Kay S, Hahn S, Marois E, Hause G, Bonas U.** 2007. A Bacterial Effector Acts as a Plant Transcription Factor and Induces a Cell Size Regulator. *Science* **318**, 648–651.
- Kechang L, Ping Z, Cash D.** 2009. Biology and Management of Major Alfalfa Diseases and Pests. Alfalfa management guide for Ningxia. United Nations Food and Agriculture Organization, .
- Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJE.** 2015. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat. Protocols* **10**, 845–858.
- Kessler SA, Shimosato-Asano H, Keinath NF, Wuest SE, Ingram G, Panstruga R, Grossniklaus U.** 2010. Conserved Molecular Components for Pollen Tube Reception and Fungal Invasion. *Science* **330**, 968.
- Kiba A, Nakano M, Vincent-Pope P, Takahashi H, Sawasaki T, Endo Y, Ohnishi K, Yoshioka H, Hikichi Y.** 2012. A novel Sec14 phospholipid transfer protein from *Nicotiana benthamiana* is up-regulated in response to *Ralstonia solanacearum* infection, pathogen associated molecular patterns and effector molecules and involved in plant immunity. *Journal of Plant Physiology* **169**, 1017–1022.
- Kiba A, Galis I, Hojo Y, Ohnishi K, Yoshioka H, Hikichi Y.** 2014. SEC14 Phospholipid Transfer Protein Is Involved in Lipid Signaling-Mediated Plant Immune Responses in *Nicotiana benthamiana* (M Gijzen, Ed.). *PLoS ONE* **9**, e98150.

- Kiba A, Imanaka Y, Nakano M, Galis I, Hojo Y, Shinya T, Ohnishi K, Hikichi Y.** 2016. Silencing of *Nicotiana benthamiana* SEC14 phospholipid transfer protein reduced jasmonic acid dependent defense against *Pseudomonas syringae*. *Plant Biotechnology* **33**, 111–115.
- Kim MG, da Cunha L, McFall AJ, Belkhadir Y, DebRoy S, Dangl JL, Mackey D.** 2005. Two *Pseudomonas syringae* Type III Effectors Inhibit RIN4-Regulated Basal Defense in *Arabidopsis*. *Cell* **121**, 749–759.
- Kishimoto K, Kouzai Y, Kaku H, Shibuya N, Minami E, Nishizawa Y.** 2011. Enhancement of MAMP signaling by chimeric receptors improves disease resistance in plants. *Plant Signaling & Behavior* **6**, 449–451.
- Klarzynski O, Plesse B, Joubert JM, Yvin JC, Kopp M, Kloareg B, Fritig B.** 2000. Linear beta-1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant Physiology* **124**, 1027–1038.
- Klingler JP, Nair RM, Edwards OR, Singh KB.** 2009. A single gene, AIN, in *Medicago truncatula* mediates a hypersensitive response to both bluegreen aphid and pea aphid, but confers resistance only to bluegreen aphid. *Journal of Experimental Botany* **60**, 4115–4127.
- Klosterman SJ, Atallah ZK, Vallad GE, Subbarao KV.** 2009. Diversity, Pathogenicity, and Management of *Verticillium* Species. *Annual Review of Phytopathology* **47**, 39–62.
- Klosterman SJ, Subbarao KV, Kang S, Veronese P, Gold SE, Thomma BPHJ, et al.** 2011. Comparative Genomics Yields Insights into Niche Adaptation of Plant Vascular Wilt Pathogens (JL Dangl, Ed.). *PLoS Pathogens* **7**, e1002137.
- Knopf RR, Adam Z.** 2012. Rhomboid proteases in plants - still in square one? *Physiologia Plantarum* **145**, 41–51.
- König S, Feussner K, Kaever A, Landesfeind M, Thurow C, Karlovsky P, Gatz C, Polle A, Feussner I.** 2014. Soluble phenylpropanoids are involved in the defense response of *Arabidopsis* against *Verticillium longisporum*. *New Phytologist* **202**, 823–837.
- Korte A, Vilhjálmsson BJ, Segura V, Platt A, Long Q, Nordborg M.** 2012. A mixed-model approach for genome-wide association studies of correlated traits in structured populations. *Nature Genetics* **44**, 1066–1071.
- Korte A, Farlow A.** 2013. The advantages and limitations of trait analysis with GWAS: a review. *Plant Methods* **9**, 29.
- Krattinger SG, Lagudah ES, Spielmeier W, Singh RP, Huerta-Espino J, McFadden H, Bossolini E, Selter LL, Keller B.** 2009. A Putative ABC Transporter Confers Durable Resistance to Multiple Fungal Pathogens in Wheat. *Science* **323**, 1360–1363.
- Krishnamurthy K, Balconi C, Sherwood JE, Giroux MJ.** 2001. Wheat Puroindolines Enhance Fungal Disease Resistance in Transgenic Rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**, 1255–1260.
- Krol E, Mentzel T, Chinchilla D, Boller T, Felix G, Kemmerling B, Postel S, Arens M, Jeworutzki E, Al-Rasheid KAS, Becker D, Hedrich R.** 2010. Perception of the *Arabidopsis* Danger Signal Peptide 1 Involves the Pattern Recognition Receptor At PEPR1 and Its Close Homologue At PEPR2. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 13471–13479.
- Kulikova O, Gualtieri G, Geurts R, Kim D-J, Cook D, Huguet T, De Jong JH, Fransz PF, Bisseling T.** 2001. Integration of the FISH pachytene and genetic maps of *Medicago truncatula*: FISH pachytene and genetic maps of *M. truncatula*. *The Plant Journal* **27**, 49–58.

- Kushalappa AC, Yogendra KN, Karre S.** 2016. Plant Innate Immune Response: Qualitative and Quantitative Resistance. *Critical Reviews in Plant Sciences* **35**, 38–55.
- Kvitko BH, Ramos AR, Morello JE, Oh H-S, Collmer A.** 2007. Identification of Harpins in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, Which Are Functionally Similar to HrpK1 in Promoting Translocation of Type III Secretion System Effectors. *Journal of Bacteriology* **189**, 8059–8072.
- Kvitko BH, Park DH, Velásquez AC, Wei C-F, Russell AB, Martin GB, Schneider DJ, Collmer A.** 2009. Deletions in the Repertoire of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 Type III Secretion Effector Genes Reveal Functional Overlap among Effectors (JL Dangl, Ed.). *PLoS Pathogens* **5**, e1000388.
- Kwon C, Neu C, Pajonk S, Yun HS, Lipka U, Humphry M, Bau S, Straus M, Kwaaitaal M, Rampelt H, Kasmi FE, Jürgens G, Parker J, Panstruga R, Lipka V, Schulze-Lefert P.** 2008. Co-option of a default secretory pathway for plant immune responses. *Nature* **451**, 835.
- Lacombe S, Rougon-Cardoso A, Sherwood E, Peeters N, Dahlbeck D, van Esse HP, Smoker M, Rallapalli G, Thomma BPHJ, Staskawicz B, Jones JDG, Zipfel C.** 2010. Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. *Nat Biotech* **28**, 365–369.
- Lagunes Espinoza L del C, Huguet T, Julier B.** 2012. Multi-population QTL detection for aerial morphogenetic traits in the model legume *Medicago truncatula*. *Theoretical and Applied Genetics* **124**, 739–754.
- Lagunes Espinoza L del C, Julier B.** 2013. QTL detection for forage quality and stem histology in four connected mapping populations of the model legume *Medicago truncatula*. *Theoretical and Applied Genetics* **126**, 497–509.
- Laluk K, AbuQamar S, Mengiste T.** 2011. The Arabidopsis Mitochondria-Localized Pentatricopeptide Repeat Protein PGN Functions in Defense against Necrotrophic Fungi and Abiotic Stress Tolerance. *Plant Physiology* **156**, 2053.
- Larsen RC, Vandemark GJ, Hughes TJ, Grau CR.** 2007. Development of a Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for Quantifying *Verticillium albo-atrum* DNA in Resistant and Susceptible Alfalfa. *Phytopathology* **97**, 1519–1525.
- Lauvergeat V, Lacomme C, Lacombe E, Lasserre E, Roby D, Grima-Pettenati J.** 2001. Two cinnamoyl-CoA reductase (CCR) genes from *Arabidopsis thaliana* are differentially expressed during development and in response to infection with pathogenic bacteria. *Phytochemistry* **57**, 1187–1195.
- Lavaud C, Baviere M, Le Roy G, Hervé MR, Moussart A, Delourme R, Pilet-Nayel M-L.** 2016. Single and multiple resistance QTL delay symptom appearance and slow down root colonization by *Aphanomyces euteiches* in pea near isogenic lines. *BMC Plant Biology* **16**.
- Lazrek F, Roussel V, Ronfort J, Cardinet G, Chardon F, Aouani ME, Huguet T.** 2009. The use of neutral and non-neutral SSRs to analyse the genetic structure of a Tunisian collection of *Medicago truncatula* lines and to reveal associations with eco-environmental variables. *Genetica* **135**, 391–402.
- Le Signor C, Savoie V, Aubert G, Verdier J, Nicolas M, Pagny G, Moussy F, Sanchez M, Baker D, Clarke J, Thompson R.** 2009. Optimizing TILLING populations for reverse genetics in *Medicago truncatula*. *Plant Biotechnology Journal* **7**, 430–441.
- Leba L-J, Cheval C, Ortiz-Martín I, Ranty B, Beuzón CR, Galaud J-P, Aldon D.** 2012. CML9, an *Arabidopsis* calmodulin-like protein, contributes to plant innate immunity through a flagellin-dependent signalling pathway: AtCML9 contributes to plant innate immunity. *The Plant Journal* **71**, 976–989.

- Lechner E, Achard P, Vansiri A, Potuschak T, Genschik P.** 2006. F-box proteins everywhere. *Current Opinion in Plant Biology* **9**, 631–638.
- Lee C, Yu D, Choi H-K, Kim RW.** 2017. Reconstruction of a composite comparative map composed of ten legume genomes. *Genes & Genomics* **39**, 111–119.
- Lee H, Ko YJ, Cha J-Y, Park SR, Ahn I, Hwang D-J.** 2013. The C-terminal region of *OsWRKY30* is sufficient to confer enhanced resistance to pathogen and activate the expression of defense-related genes. *Plant Biotechnology Reports* **7**, 221–230.
- Lee J, Klusener B, Tsiamis G, Stevens C, Neyt C, Tampakaki AP, Panopoulos NJ, Noller J, Weiler EW, Cornelis GR, Mansfield JW, Nurnberger T.** 2001. HrpZPsph from the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* binds to lipid bilayers and forms an ion-conducting pore *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 289–294.
- Lee T-Y, Bretaña NA, Lu C-T.** 2011. PlantPhos: using maximal dependence decomposition to identify plant phosphorylation sites with substrate site specificity. *BMC Bioinformatics* **12**, 261.
- Leister RT, Ausubel FM, Katagiri F.** 1996. Molecular recognition of pathogen attack occurs inside of plant cells in plant disease resistance specified by the *Arabidopsis* genes *RPS2* and *RPM1*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 15497–15502.
- Lemken D, Spiller A, von Meyer-Höfer M.** 2017. The Case of Legume-Cereal Crop Mixtures in Modern Agriculture and the Transtheoretical Model of Gradual Adoption. *Ecological Economics* **137**, 20–28.
- van Lenteren JC, Bolckmans K, Köhl J, Ravensberg WJ, Urbaneja A.** 2018. Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. *BioControl* **63**, 39–59.
- Lenth R.** 2016. Package ‘lsmmeans’. R package version 2-26-3.
- Li H, Peng Z, Yang X, Wang W, Fu J, Wang J, et al.** 2012a. Genome-wide association study dissects the genetic architecture of oil biosynthesis in maize kernels. *Nature Genetics* **45**, 43–50.
- Li J, Dai X, Liu T, Zhao PX.** 2012b. LegumeIP: an integrative database for comparative genomics and transcriptomics of model legumes. *Nucleic Acids Research* **40**, D1221–D1229.
- Li J, Wang J, Wang N, Guo X, Gao Z.** 2015a. GhWRKY44, a WRKY transcription factor of cotton, mediates defense responses to pathogen infection in transgenic *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **121**, 127–140.
- Li J, Henty-Ridilla JL, Staiger BH, Day B, Staiger CJ.** 2015b. Capping protein integrates multiple MAMP signalling pathways to modulate actin dynamics during plant innate immunity. *Nature Communications* **6**, 7206.
- Li L, Li M, Yu L, Zhou Z, Liang X, Liu Z, Cai G, Gao L, Zhang X, Wang Y, Chen S, Zhou J-M.** 2014a. The FLS2-Associated Kinase BIK1 Directly Phosphorylates the NADPH Oxidase RbohD to Control Plant Immunity. *Cell Host & Microbe* **15**, 329–338.
- Li N-Y, Ma X-F, Short DPG, Li T-G, Zhou L, Gui Y-J, Kong Z-Q, Zhang D-D, Zhang W-Q, Li J-J, Subbarao KV, Chen J-Y, Dai X-F.** accepted. The Island Cotton NBS-LRR Gene GbaNA1 Confers Resistance to the Non-race 1 *Verticillium dahliae* Isolate Vd991. *Molecular Plant Pathology*.
- Li T, Ma X, Li N, Zhou L, Liu Z, Han H, Gui Y, Bao Y, Chen J, Dai X.** 2017. Genome-wide association study discovered candidate genes of *Verticillium* wilt resistance in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Biotechnology Journal*.

- Li W, Wang F, Wang J, Fan F, Zhu J, Yang J, Liu F, Zhong W.** 2015c. Overexpressing CYP71Z2 Enhances Resistance to Bacterial Blight by Suppressing Auxin Biosynthesis in Rice (Y-W He, Ed.). *PLOS ONE* **10**, e0119867.
- Li X, Brummer EC.** 2012. Applied Genetics and Genomics in Alfalfa Breeding. *Agronomy* **2**, 40–61.
- Li X, Zhang Y, Huang L, Ouyang Z, Hong Y, Zhang H, Li D, Song F.** 2014b. Tomato SIMKK2 and SIMKK4 contribute to disease resistance against *Botrytis cinerea*. *BMC Plant Biology* **14**, 166.
- Li X, Wei Y, Acharya A, Jiang Q, Kang J, Brummer EC.** 2014c. A Saturated Genetic Linkage Map of Autotetraploid Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Developed Using Genotyping-by-Sequencing Is Highly Syntenous with the *Medicago truncatula* Genome. *G3: Genes|Genomes|Genetics* **4**, 1971–1979.
- Li Y, Huang Y, Bergelson J, Nordborg M, Borevitz JO.** 2010. Association mapping of local climate-sensitive quantitative trait loci in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 21199–21204.
- Li Y-B, Han L-B, Wang H-Y, Zhang J, Sun S-T, Feng D-Q, Yang C-L, Sun Y-D, Zhong N-Q, Xia G-X.** 2016. The Thioredoxin GbNRX1 Plays a Crucial Role in Homeostasis of Apoplastic Reactive Oxygen Species in Response to *Verticillium dahliae* Infection in Cotton. *Plant Physiology* **170**, 2392.
- Liatukienė A, Liatukas Ž, Ruzgas V.** 2012. Relationships among alfalfa resistance to Sclerotinia crown and stem rot, *Sclerotinia trifoliorum* and oxalic acid. *AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY* **11**.
- Liebrand TWH, van den Berg GCM, Zhang Z, Smit P, Cordewener JHG, America AHP, Sklenar J, Jones AME, Tameling WIL, Robatzek S, Thomma BPHJ, Joosten MHAJ.** 2013. Receptor-like kinase SOBIR1/EVR interacts with receptor-like proteins in plant immunity against fungal infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 10010–10015.
- Lin W, Li B, Lu D, Chen S, Zhu N, He P, Shan L.** 2014. Tyrosine phosphorylation of protein kinase complex BAK1/BIK1 mediates *Arabidopsis* innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 3632–3637.
- Lipka AE, Kandianis CB, Hudson ME, Yu J, Drnevich J, Bradbury PJ, Gore MA.** 2015. From association to prediction: statistical methods for the dissection and selection of complex traits in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **24**, 110–118.
- Liu B, Ouyang Z, Zhang Y, Li X, Hong Y, Huang L, Liu S, Zhang H, Li D, Song F.** 2014a. Tomato NAC Transcription Factor SISR1 Positively Regulates Defense Response against Biotic Stress but Negatively Regulates Abiotic Stress Response (H Lu, Ed.). *PLoS ONE* **9**, e102067.
- Liu B, Hong Y-B, Zhang Y-F, Li X-H, Huang L, Zhang H-J, Li D-Y, Song F-M.** 2014b. Tomato WRKY transcriptional factor SDRW1 is required for disease resistance against *Botrytis cinerea* and tolerance to oxidative stress. *Plant Science* **227**, 145–156.
- Liu J, Elmore JM, Lin Z-JD, Coaker G.** 2011a. A Receptor-like Cytoplasmic Kinase Phosphorylates the Host Target RIN4, Leading to the Activation of a Plant Innate Immune Receptor. *Cell Host & Microbe* **9**, 137–146.
- Liu J, Wang Y, Zhao G, Zhao J, Du H, He X, Zhang H.** 2017. A novel *Gossypium barbadense* ERF transcription factor, *GbERFb*, regulation host response and resistance to *Verticillium dahliae* in tobacco. *Physiology and Molecular Biology of Plants* **23**, 125–134.

- Liu J-Z, Horstman HD, Braun E, Graham MA, Zhang C, Navarre D, Qiu W-L, Lee Y, Nettleton D, Hill JH, Whitham SA.** 2011b. Soybean Homologs of MPK4 Negatively Regulate Defense Responses and Positively Regulate Growth and Development. *Plant Physiology* **157**, 1363.
- Liu N, Sun Y, Pei Y, Zhang X, Wang P, Li X, Li F, Hou Y.** 2018. A Pectin Methylesterase Inhibitor Enhances Resistance to *Verticillium* Wilt. *Plant Physiology*.
- Liu S, Kandoth PK, Warren SD, Yeckel G, Heinz R, Alden J, Yang C, Jamai A, El-Mellouki T, Juvalé PS, Hill J, Baum TJ, Cianzio S, Whitham SA, Korkin D, Mitchum MG, Meksem K.** 2016. A soybean cyst nematode resistance gene points to a new mechanism of plant resistance to pathogens. *Nature*, 256–260.
- Livak KJ, Schmittgen TD.** 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* **25**, 402–408.
- Lively CM, Johnson SG, Delph LF, Clay K.** 1995. Thinning Reduces the Effect of Rust Infection on Jewelweed (*Impatiens Capensis*). *Ecology* **76**, 1859–1862.
- Lo Presti L, Lanver D, Schweizer G, Tanaka S, Liang L, Tollot M, Zuccaro A, Reissmann S, Kahmann R.** 2015. Fungal Effectors and Plant Susceptibility. *Annual Review of Plant Biology* **66**, 513–545.
- Lobet G, Draye X.** 2013. Novel scanning procedure enabling the vectorization of entire rhizotron-grown root systems. *Plant Methods* **9**, 1.
- Lopez MC, Nicaud JM, Skinner HB, Vergnolle C, Kader JC, Bankaitis VA, Gaillardin C.** 1994. A phosphatidylinositol/phosphatidylcholine transfer protein is required for differentiation of the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica* from the yeast to the mycelial form. *The Journal of Cell Biology* **125**, 113–127.
- Lorrain S.** 2003. Lesion mimic mutants: keys for deciphering cell death and defense pathways in plants? *Trends in Plant Science* **8**, 263–271.
- Louthan AM, Kay KM.** 2011. Comparing the adaptive landscape across trait types: larger QTL effect size in traits under biotic selection. *BMC Evolutionary Biology* **11**.
- Lu D, Wu S, Gao X, Zhang Y, Shan L, He P.** 2010. A receptor-like cytoplasmic kinase, BIK1, associates with a flagellin receptor complex to initiate plant innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 496–501.
- Lucas H, Feuerbach F, Kunert K, Grandbastien MA, Caboche M.** 1995. RNA-mediated transposition of the tobacco retrotransposon *Tnt1* in *Arabidopsis thaliana*. *The EMBO journal* **14**, 2364–2373.
- Lumbreras V, Vilela B, Irar S, Solé M, Capellades M, Valls M, Coca M, Pagès M.** 2010. MAPK phosphatase MKP2 mediates disease responses in *Arabidopsis* and functionally interacts with MPK3 and MPK6. *The Plant Journal* **63**, 1017–1030.
- Luna E, Bruce TJ, Roberts MR, Flors V, Ton J.** 2012. Next-Generation Systemic Acquired Resistance. *Plant Physiology* **158**, 844–853.
- Luo X, Xie C, Dong J, Yang X, Sui A.** 2014. Interactions between *Verticillium dahliae* and its host: vegetative growth, pathogenicity, plant immunity. *Applied Microbiology and Biotechnology*.
- Mackey D, Holt BF, Wiig A, Dangl JL.** 2002. RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in *Arabidopsis*. *Cell* **108**, 743–754.

- Mackey D, Belkhadir Y, Alonso JM, Ecker JR, Dangl JL.** 2003. *Arabidopsis* RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. *Cell* **112**, 379–389.
- Madrid E, Barilli E, Gil J, Huguet T, Gentzbittel L, Rubiales D.** 2014. Detection of partial resistance quantitative trait loci against *Didymella pinodes* in *Medicago truncatula*. *Molecular Breeding* **33**, 589–599.
- Maimbo M, Ohnishi K, Hikichi Y, Yoshioka H, Kiba A.** 2010. S-Glycoprotein-Like Protein Regulates Defense Responses in *Nicotiana* Plants against *Ralstonia solanacearum*. *PLANT PHYSIOLOGY* **152**, 2023–2035.
- Maldonado-Gonzalez MM, Bakker PAHM, Prieto P, Mercado-Blanco J.** 2015. *Arabidopsis thaliana* as a tool to identify traits involved in *Verticillium dahliae* biocontrol by the olive root endophyte *Pseudomonas fluorescens* PICF7. *Frontiers in Microbiology* **06**.
- Małolepszy A, Mun T, Sandal N, Gupta V, Dubin M, Urbański D, et al.** 2016. The *LORE1* insertion mutant resource. *The Plant Journal* **88**, 306–317.
- Mammadov J, Sun X, Gao Y, Ochsenfeld C, Bakker E, Ren R, Flora J, Wang X, Kumpatla S, Meyer D, Thompson S.** 2015. Combining powers of linkage and association mapping for precise dissection of QTL controlling resistance to gray leaf spot disease in maize (*Zea mays* L.). *BMC Genomics* **16**, 916.
- Mandal MK, Chandra-Shekara A, Jeong R-D, Yu K, Zhu S, Chanda B, Navarre D, Kachroo A, Kachroo P.** 2012. Oleic Acid-Dependent Modulation of NITRIC OXIDE ASSOCIATED1 Protein Levels Regulates Nitric Oxide-Mediated Defense Signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **24**, 1654–1674.
- Manna S.** 2015. An overview of pentatricopeptide repeat proteins and their applications. *Biochimie* **113**, 93–99.
- Marchini J, Donnelly P, Cardon LR.** 2005. Genome-wide strategies for detecting multiple loci that influence complex diseases. *Nature Genetics* **37**, 413–417.
- Maroti G, Kondorosi E.** 2014. Nitrogen-fixing Rhizobium-legume symbiosis: are polyploidy and host peptide-governed symbiont differentiation general principles of endosymbiosis? *Frontiers in Microbiology* **5**.
- Mattinen L, Tshuikina M, Mäe A, Pirhonen M.** 2004. Identification and Characterization of Nip, Necrosis-Inducing Virulence Protein of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**, 1366–1375.
- Matyssek R, Kozovits AR, Schnitzler J-P, Pretzsch H, Dieler J, Wieser G.** 2014. Forest Trees Under Air Pollution as a Factor of Climate Change. In: Tausz M,, In: Grulke N, eds. *Trees in a Changing Environment: Ecophysiology, Adaptation, and Future Survival*. Dordrecht: Springer Netherlands, 117–163.
- Maury S, Geoffroy P, Legrand M.** 1999. Tobacco O-methyltransferases involved in phenylpropanoid metabolism. The different caffeoyl-coenzyme A/5-hydroxyferuloyl-coenzyme A 3/5-O-methyltransferase and caffeic acid/5-hydroxyferulic acid 3/5-O-methyltransferase classes have distinct substrate specificities and expression patterns. *Plant Physiology* **121**, 215–224.
- Mazaheri-Naeini M, Sabbagh SK, Martinez Y, Séjalon-Delmas N, Roux C.** 2015. Assessment of *Ustilago maydis* as a fungal model for root infection studies. *Fungal Biology* **119**, 145–153.
- McCully M.** 2001. Niches for bacterial endophytes in crop plants: a plant biologist's view. *Functional Plant Biology* **28**, 983–990.

- McDonald BA, Linde C.** 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* **40**, 349–379.
- McLeod AG, Thomson R.** 1959. Verticillium wilt of tobacco: II. Field and glasshouse trials to determine resistance of varieties and species to *Verticillium dahliae* Kleb. *New Zealand Journal of Agricultural Research* **2**, 792–796.
- Mei C, Qi M, Sheng G, Yang Y.** 2006. Inducible Overexpression of a Rice Allene Oxide Synthase Gene Increases the Endogenous Jasmonic Acid Level, *PR* Gene Expression, and Host Resistance to Fungal Infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**, 1127–1137.
- Meng Y, Hou Y, Wang H, Ji R, Liu B, Wen J, Niu L, Lin H.** 2017. Targeted mutagenesis by CRISPR/Cas9 system in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Cell Reports* **36**, 371–374.
- Mengiste T.** 2003. The BOTRYTIS SUSCEPTIBLE1 Gene Encodes an R2R3MYB Transcription Factor Protein That Is Required for Biotic and Abiotic Stress Responses in *Arabidopsis*. *THE PLANT CELL ONLINE* **15**, 2551–2565.
- Meuwissen THE, Hayes BJ, Goddard ME.** 2001. Prediction of Total Genetic Value Using Genome-Wide Dense Marker Maps. *Genetics* **157**, 1819.
- Miao W, Wang X, Li M, Song C, Wang Y, Hu D, Wang J.** 2010. Genetic transformation of cotton with a harpin-encoding gene HpaXoo confers an enhanced defense response against different pathogens through a priming mechanism. *BMC Plant Biology* **10**, 67.
- Michael F. Lyngkjær, Adrian C. Newton, Jannie L. Atzema, Susan J. Baker.** 2000. The Barley mlo-gene: an important powdery mildew resistance source. *Agronomie* **20**, 745–756.
- Michielse CB, Rep M.** 2009. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology* **10**, 311–324.
- Michno J-M, Wang X, Liu J, Curtin SJ, Kono TJ, Stupar RM.** 2015. CRISPR/Cas mutagenesis of soybean and *Medicago truncatula* using a new web-tool and a modified Cas9 enzyme. *GM Crops & Food* **6**, 243–252.
- Miklis M, Consonni C, Bhat RA, Lipka V, Schulze-Lefert P, Panstruga R.** 2007. Barley MLO Modulates Actin-Dependent and Actin-Independent Antifungal Defense Pathways at the Cell Periphery. *Plant Physiology* **144**, 1132.
- Mishina TE, Zeier J.** 2007. Bacterial non-host resistance: interactions of *Arabidopsis* with non-adapted *Pseudomonas syringae* strains. *Physiologia Plantarum* **131**, 448–461.
- Miya A, Albert P, Shinya T, Desaki Y, Ichimura K, Shirasu K, Narusaka Y, Kawakami N, Kaku H, Shibuya N.** 2007. CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 19613–19618.
- Mo P, Zhu Y, Liu X, Zhang A, Yan C, Wang D.** 2007. Identification of two phosphatidylinositol/phosphatidylcholine transfer protein genes that are predominately transcribed in the flowers of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology* **164**, 478–486.
- Möbius N, Hertweck C.** 2009. Fungal phytotoxins as mediators of virulence. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 390–398.
- Moeder W, Yoshioka K.** 2008. Lesion mimic mutants. *Plant Signaling & Behavior* **3**, 764–767.

- Molinéro-Demilly V, Montegano B, Julier B, Giroult C, Baudouin P, Chosson JF, Bayle B, Noël D, Guénard M, Gensollen V.** 2006. Resistance to *Verticillium albo-atrum* in lucerne (*Medicago sativa* L.) to distinguish between varieties. *Euphytica* **153**, 227–232.
- Molinier J, Ries G, Zipfel C, Hohn B.** 2006. Transgeneration memory of stress in plants. *Nature* **442**, 1046–1049.
- Monjazebl AM, High KP, Connoy A, Hart LS, Koumenis C, Chilton FH.** 2006. Arachidonic acid-induced gene expression in colon cancer cells. *Carcinogenesis* **27**, 1950–1960.
- Monks DE, Aghoram K, Courtney PD, DeWald DB, Dewey RE.** 2001. Hyperosmotic Stress Induces the Rapid Phosphorylation of a Soybean Phosphatidylinositol Transfer Protein Homolog through Activation of the Protein Kinases SPK1 and SPK2. *The Plant Cell* **13**, 1205–1220.
- Montillet J-L, Leonhardt N, Mondy S, Tranchimand S, Rumeau D, Boudsocq M, Garcia AV, Douki T, Bigeard J, Laurière C, Chevalier A, Castresana C, Hirt H.** 2013. An Absciscic Acid-Independent Oxylinin Pathway Controls Stomatal Closure and Immune Defense in *Arabidopsis*. *PLOS Biology* **11**, e1001513.
- Moore JW, Herrera-Foessel S, Lan C, Schnippenkoetter W, Ayliffe M, Huerta-Espino J, Lillemo M, Viccars L, Milne R, Periyannan S, Kong X, Spielmeyer W, Talbot M, Bariana H, Patrick JW, Dodds P, Singh R, Lagudah E.** 2015. A recently evolved hexose transporter variant confers resistance to multiple pathogens in wheat. *Nature Genetics* **47**, 1494.
- Mordecai EA.** 2011. Pathogen impacts on plant communities: unifying theory, concepts, and empirical work. *Ecological Monographs* **81**, 429–441.
- Moreau D, Burstin J, Aubert G, Huguet T, Ben C, Prosperi J-M, Salon C, Munier-Jolain N.** 2012. Using a physiological framework for improving the detection of quantitative trait loci related to nitrogen nutrition in *Medicago truncatula*. *Theoretical and Applied Genetics* **124**, 755–768.
- Moriuchi KS, Friesen ML, Cordeiro MA, Badri M, Vu WT, Main BJ, Aouani ME, Nuzhdin SV, Strauss SY, von Wettberg EJB.** 2016. Salinity Adaptation and the Contribution of Parental Environmental Effects in *Medicago truncatula* (R Balestrini, Ed.). *PLOS ONE* **11**, e0150350.
- Moury B, Charron C, Janzac B, Simon V, Gallois JL, Palloix A, Caranta C.** 2014. Evolution of plant eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) and potyvirus genome-linked protein (VPg): A game of mirrors impacting resistance spectrum and durability. *Infection, Genetics and Evolution* **27**, 472–480.
- Mudgett MB, Chesnokova O, Dahlbeck D, Clark ET, Rossier O, Bonas U, Staskawicz BJ.** 2000. Molecular signals required for type III secretion and translocation of the *Xanthomonas campestris* AvrBs2 protein to pepper plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 13324–13329.
- Mun J-H, Kim D-J, Choi H-K, Gish J, Debellé F, Mudge J, Denny R, Endré G, Saurat O, Dudez A-M, Kiss GB, Roe B, Young ND, Cook DR.** 2006. Distribution of Microsatellites in the Genome of *Medicago truncatula*: A Resource of Genetic Markers That Integrate Genetic and Physical Maps. *Genetics* **172**, 2541–2555.
- Murashige T, Skoog F.** 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473–497.
- Muroi A, Ishihara A, Tanaka C, Ishizuka A, Takabayashi J, Miyoshi H, Nishioka T.** 2009. Accumulation of hydroxycinnamic acid amides induced by pathogen infection and identification of agmatine coumaroyltransferase in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **230**, 517–527.

- Murray MG, Thompson WF.** 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* **8**, 4321–4326.
- Muthamilarasan M, Prasad M.** 2013. Plant innate immunity: An updated insight into defense mechanism. *Journal of Biosciences* **38**, 433–449.
- Nair R, Hughes S, Ellwood S, Greene S, Delalande M, Wen J, Oldroyd G.** 2006. *Medicago truncatula* stock centres. The *Medicago truncatula* handbook. (Eds MU, J EP and S LW). (Samuel Roberts Noble Foundation: Ardmore, OK).
- Naito K, Taguchi F, Suzuki T, Inagaki Y, Toyoda K, Shiraishi T, Ichinose Y.** 2008. Amino Acid Sequence of Bacterial Microbe-Associated Molecular Pattern flg22 Is Required for Virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**, 1165–1174.
- Nandi A, Krothapalli K, Buseman CM, Li M, Welti R, Enyedi A, Shah J.** 2003. Arabidopsis *sfd* Mutants Affect Plastidic Lipid Composition and Suppress Dwarfing, Cell Death, and the Enhanced Disease Resistance Phenotypes Resulting from the Deficiency of a Fatty Acid Desaturase. *The Plant Cell* **15**, 2383.
- Nandi A, Moeder W, Kachroo P, Klessig DF, Shah J.** 2005. Arabidopsis *ssi2* -Conferred Susceptibility to *Botrytis cinerea* Is Dependent on *EDS5* and *PAD4*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**, 363–370.
- Narusaka M, Shirasu K, Noutoshi Y, Kubo Y, Shiraishi T, Iwabuchi M, Narusaka Y.** 2009. *RRS1* and *RPS4* provide a dual *Resistance*- gene system against fungal and bacterial pathogens. *The Plant Journal* **60**, 218–226.
- Navarro L, Zipfel C, Rowland O, Keller I, Robatzek S, Boller T, Jones JDG.** 2004. The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant Physiology* **135**, 1113–1128.
- Nawrot R, Barylski J, Nowicki G, Broniarczyk J, Buchwald W, Goździcka-Józefiak A.** 2014. Plant antimicrobial peptides. *Folia Microbiologica* **59**, 181–196.
- Nees von Esenbeck CG.** 1816. *Das system der pilze und schwämme*. Würzburg : Stahelschen Buchhandlung.
- Negahi A, Sarrafi A, Ebrahimi A, Maury P, Prospéri JM, Ben C, Rickauer M.** 2013. Genetic variability of tolerance to *Verticillium albo-atrum* and *Verticillium dahliae* in *Medicago truncatula*. *European Journal of Plant Pathology* **136**, 135–143.
- Negahi A, Ben C, Gentzbittel L, Maury P, Nabipour AR, Ebrahimi A, Sarrafi A, Rickauer M.** 2014. Quantitative trait loci associated with resistance to a potato isolate of *Verticillium albo-atrum* in *Medicago truncatula*. *Plant Pathology*, 308–315.
- Neilson RP, Pitelka LF, Solomon AM, Nathan R, Midgley GF, Fragoso JMV, Lischke H, Thompson K.** 2005. Forecasting Regional to Global Plant Migration in Response to Climate Change. *BioScience* **55**, 749.
- Nicotra AB, Atkin OK, Bonser SP, Davidson AM, Finnegan EJ, Mathesius U, Poot P, Purugganan MD, Richards CL, Valladares F, van Kleunen M.** 2010. Plant phenotypic plasticity in a changing climate. *Trends in Plant Science* **15**, 684–692.
- Niks R, Walther U, Jaiser H, Martinez F, Rubiales D.** 2000. Resistance against barley leaf rust (*Puccinia hordei*) in West-European spring barley germplasm. *Agronomie* **20**, 769–782.

- Niks RE, Qi X, Marcel TC.** 2015. Quantitative Resistance to Biotrophic Filamentous Plant Pathogens: Concepts, Misconceptions, and Mechanisms. *Annual Review of Phytopathology* **53**, 445–470.
- Nile AH, Bankaitis VA, Grabon A.** 2010. Mammalian diseases of phosphatidylinositol transfer proteins and their homologs. *Clinical lipidology* **5**, 867–897.
- Niño-Liu DO, Ronald PC, Bogdanove AJ.** 2006. *Xanthomonas oryzae* pathovars: model pathogens of a model crop. *Molecular Plant Pathology* **7**, 303–324.
- Nomura H, Komori T, Uemura S, Kanda Y, Shimotani K, Nakai K, Furuichi T, Takebayashi K, Sugimoto T, Sano S, Suwastika IN, Fukusaki E, Yoshioka H, Nakahira Y, Shiina T.** 2012. Chloroplast-mediated activation of plant immune signalling in *Arabidopsis*. *Nature Communications* **3**, 926.
- Nomura K, DebRoy S, Lee YH, Pumpilin N, Jones J, He SY.** 2006. A Bacterial Virulence Protein Suppresses Host Innate Immunity to Cause Plant Disease. *Science* **313**, 220–223.
- Nühse TS, Bottrill AR, Jones AME, Peck SC.** 2007. Quantitative phosphoproteomic analysis of plasma membrane proteins reveals regulatory mechanisms of plant innate immune responses. *The Plant Journal* **51**, 931–940.
- Oelmüller R, Peskan-Berghofer T, Shahollari B, Trebicka A, Sherameti I, Varma A.** 2005. MATH domain proteins represent a novel protein family in *Arabidopsis thaliana*, and at least one member is modified in roots during the course of a plant-microbe interaction. *Physiologia Plantarum* **124**, 152–166.
- Oerke E.** 2007. Crop Losses to Animal Pests, Plant Pathogens, and Weeds. In: Pimentel D, ed. *Encyclopedia of Pest Management*, Volume II. CRC Press, 116–120.
- Oerke E-C, Dehne H-W, Schönbeck F, Weber A (Eds.).** 1994. *Crop production and crop protection: estimated losses in major food and cash crops*. Amsterdam: Elsevier.
- Oerke E-C, Dehne H-W.** 2004. Safeguarding production—losses in major crops and the role of crop protection. *Crop Protection* **23**, 275–285.
- Oerke E-C.** 2006. Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science* **144**, 31.
- Ogata T, Kida Y, Arai T, Kishi Y, Manago Y, Murai M, Matsushita Y.** 2012. Overexpression of tobacco ethylene response factor NtERF3 gene and its homologues from tobacco and rice induces hypersensitive response-like cell death in tobacco. *Journal of General Plant Pathology* **78**, 8–17.
- Oh S, Lee J, Kwon M-S, Weir B, Ha K, Park T.** 2012. A novel method to identify high order gene-gene interactions in genome-wide association studies: Gene-based MDR. *BMC Bioinformatics* **13**, S5.
- O'Rourke JA, Bolon Y-T, Bucciarelli B, Vance CP.** 2014. Legume genomics: understanding biology through DNA and RNA sequencing. *Annals of Botany* **113**, 1107–1120.
- O'Rourke JA, Fu F, Bucciarelli B, Yang SS, Samac DA, Lamb JFS, Monteros MJ, Graham MA, Gronwald JW, Krom N, Li J, Dai X, Zhao PX, Vance CP.** 2015. The *Medicago sativa* gene index 1.2: a web-accessible gene expression atlas for investigating expression differences between *Medicago sativa* subspecies. *BMC Genomics* **16**.
- Osman H, Vauthrin S, Mikes V, Milat ML, Panabières F, Marais A, Brunie S, Maume B, Ponchet M, Blein JP.** 2001. Mediation of elicitor activity on tobacco is assumed by elicitor-sterol complexes. *Molecular Biology of the Cell* **12**, 2825–2834.

- Ossowski S, Schwab R, Weigel D.** 2008. Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs: Engineering small RNA-mediated gene silencing. *The Plant Journal* **53**, 674–690.
- Palacio-López K, Beckage B, Scheiner S, Molofsky J.** 2015. The ubiquity of phenotypic plasticity in plants: a synthesis. *Ecology and Evolution* **5**, 3389–3400.
- Papasotiriou FG, Varypatakis KG, Christofi N, Tjamos SE, Paplomatas EJ.** 2013. Olive mill wastes: A source of resistance for plants against *Verticillium dahliae* and a reservoir of biocontrol agents. *Biological Control* **67**, 51–60.
- Pathuri IP, Reitberger IE, Hückelhoven R, Proels RK.** 2011. Alcohol dehydrogenase 1 of barley modulates susceptibility to the parasitic fungus *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*. *Journal of Experimental Botany* **62**, 3449–3457.
- Pavan S, Zheng Z, Borisova M, van den Berg P, Lotti C, De Giovanni C, Lindhout P, de Jong H, Ricciardi L, Visser RGF, Bai Y.** 2008. Map- vs. homology-based cloning for the recessive gene ol-2 conferring resistance to tomato powdery mildew. *Euphytica* **162**, 91–98.
- Pavan S, Jacobsen E, Visser RGF, Bai Y.** 2010. Loss of susceptibility as a novel breeding strategy for durable and broad-spectrum resistance. *Molecular Breeding* **25**, 1–12.
- Pavan S, Schiavulli A, Appiano M, Marcotrigiano AR, Cillo F, Visser RGF, Bai Y, Lotti C, Ricciardi L.** 2011. Pea powdery mildew er1 resistance is associated to loss-of-function mutations at a MLO homologous locus. *Theoretical and Applied Genetics* **123**, 1425–1431.
- Peiro A, Izquierdo-Garcia AC, Sanchez-Navarro JA, Pallas V, Mulet JM, Aparicio F.** 2014. Patellins 3 and 6, two members of the Plant Patellin family, interact with the movement protein of *A. lfalla mosaic virus* and interfere with viral movement: Interaction of AMV MP with patellins. *Molecular Plant Pathology*, n/a-n/a.
- Peterman TK, Ohol YM, McReynolds LJ, Luna EJ.** 2004. Patellin1, a novel Sec14-like protein, localizes to the cell plate and binds phosphoinositides. *Plant Physiology* **136**, 3080–3094; discussion 3001–3002.
- Petersen LN, Ingle RA, Knight MR, Denby KJ.** 2009. OXI1 protein kinase is required for plant immunity against *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **60**, 3727–3735.
- Petersen M, Brodersen P, Naested H, Andreasson E, Lindhart U, Johansen B, Nielsen HB, Lacy M, Austin MJ, Parker JE, Sharma SB, Klessig DF, Martienssen R, Mattsson O, Jensen AB, Mundy J.** 2000. *Arabidopsis* map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* **103**, 1111–1120.
- Phillips SE, Vincent P, Rizzieri KE, Schaaf G, Bankaitis VA, Gaucher EA.** 2006. The Diverse Biological Functions of Phosphatidylinositol Transfer Proteins in Eukaryotes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **41**, 21–49.
- Pierre J-B, Huguet T, Barre P, Huyghe C, Julier B.** 2008. Detection of QTLs for flowering date in three mapping populations of the model legume species *Medicago truncatula*. *Theoretical and Applied Genetics* **117**, 609–620.
- Pigliucci M.** 2005. Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now? *Trends in Ecology & Evolution* **20**, 481–486.
- Pilet-Nayel M-L, Prospéri J-M, Hamon C, Lesné A, Lecointe R, Le Goff I, Hervé M, Deniot G, Delalande M, Huguet T, Jacquet C, Baranger A.** 2009. *AER1*, a Major Gene Conferring Resistance to *Aphanomyces euteiches* in *Medicago truncatula*. *Phytopathology* **99**, 203–208.

- Pinheiro J, DebRoy S, Sarkar D.** 2012. nlme: linear and nonlinear mixed effects models. R package version 3.1-131.
- Platt TG, Bever JD, Fuqua C.** 2012. A cooperative virulence plasmid imposes a high fitness cost under conditions that induce pathogenesis. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **279**, 1691.
- Poland J, Rutkoski J.** 2016. Advances and Challenges in Genomic Selection for Disease Resistance. *Annual Review of Phytopathology* **54**, 79–98.
- Pollier J, Morreel K, Geelen D, Goossens A.** 2011. Metabolite Profiling of Triterpene Saponins in *Medicago truncatula* Hairy Roots by Liquid Chromatography Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Journal of Natural Products* **74**, 1462–1476.
- Popp J, Pető K, Nagy J.** 2013. Pesticide productivity and food security. A review. *Agronomy for Sustainable Development* **33**, 243–255.
- Porter K, Shimono M, Tian M, Day B.** 2012. *Arabidopsis* Actin-Depolymerizing Factor-4 Links Pathogen Perception, Defense Activation and Transcription to Cytoskeletal Dynamics. *PLOS Pathogens* **8**, e1003006.
- Prosperi J-M, Jenczewski E, Muller M-H, Fourtier S, Sampoux J-P, Ronfort J.** 2014. Alfalfa domestication history, genetic diversity and genetic resources. *Legume Perspectives* **4**, 13–14.
- Prost I, Dhondt S, Rothe G, Vicente J, Rodriguez MJ, Kift N, Carbonne F, Griffiths G, Esquerré-Tugayé M-T, Rosahl S, Castresana C, Hamberg M, Fournier J.** 2005. Evaluation of the Antimicrobial Activities of Plant Oxylipins Supports Their Involvement in Defense against Pathogens. *Plant Physiology* **139**, 1902.
- Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MAR, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker PIW, Daly MJ, Sham PC.** 2007. PLINK: A Tool Set for Whole-Genome Association and Population-Based Linkage Analyses. *The American Journal of Human Genetics* **81**, 559–575.
- Quandt H-J.** 1993. Transgenic Root Nodules of *Vicia hirsuta*: A Fast and Efficient System for the Study of Gene Expression in Indeterminate-Type Nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **6**, 699.
- Rafalski JA.** 2010. Association genetics in crop improvement. *Current Opinion in Plant Biology* **13**, 174–180.
- Raffaele S, Vaillau F, Leger A, Joubes J, Miersch O, Huard C, Blee E, Mongrand S, Domergue F, Roby D.** 2008. A MYB Transcription Factor Regulates Very-Long-Chain Fatty Acid Biosynthesis for Activation of the Hypersensitive Cell Death Response in *Arabidopsis*. *THE PLANT CELL ONLINE* **20**, 752–767.
- Rairdan G, Moffett P.** 2007. Brothers in arms? Common and contrasting themes in pathogen perception by plant NB-LRR and animal NACHT-LRR proteins. *Microbes and Infection* **9**, 677–686.
- Rajarammohan S, Pradhan AK, Pental D, Kaur J.** 2018. Genome-wide association mapping in *Arabidopsis* identifies novel genes underlying quantitative disease resistance to *Alternaria brassicae*. *Molecular Plant Pathology*, **19**, 1719-1732.
- Ramírez-Suero M, Khanshour A, Martinez Y, Rickauer M.** 2010. A study on the susceptibility of the model legume plant *Medicago truncatula* to the soil-borne pathogen *Fusarium oxysporum*. *European Journal of Plant Pathology* **126**, 517–530.
- Ranathunge K, Thomas RH, Fang X, Peterson CA, Gijzen M, Bernard MA.** 2008. Soybean Root Suberin and Partial Resistance to Root Rot Caused by *Phytophthora sojae*. *Phytopathology* **98**, 1179–1189.

- Rancé I, Fournier J, Esquerré-Tugayé M-T.** 1998. The incompatible interaction between *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* race 0 and tobacco is suppressed in transgenic plants expressing antisense lipoxygenase sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 6554–6559.
- Rasmann S, De Vos M, Casteel CL, Tian D, Halitschke R, Sun JY, Agrawal AA, Felton GW, Jander G.** 2012. Herbivory in the Previous Generation Primes Plants for Enhanced Insect Resistance. *Plant Physiology* **158**, 854.
- Ravensdale M, Bernoux M, Ve T, Kobe B, Thrall PH, Ellis JG, Dodds PN.** 2012. Intramolecular Interaction Influences Binding of the Flax L5 and L6 Resistance Proteins to their AvrL567 Ligands (J-R Xu, Ed.). *PLoS Pathogens* **8**, e1003004.
- Rawat N, Pumphrey MO, Liu S, Zhang X, Tiwari VK, Ando K, Trick HN, Bockus WW, Akhunov E, Anderson JA, Gill BS.** 2016. Wheat *Fhb1* encodes a chimeric lectin with agglutinin domains and a pore-forming toxin-like domain conferring resistance to Fusarium head blight. *Nature Genetics* **48**, 1576–1580.
- Rehmany AP, Gordon A, Rose LE, Allen RL, Armstrong MR, Whisson SC, Kamoun S, Tyler BM, Birch PRJ, Beynon JL.** 2005. Differential Recognition of Highly Divergent Downy Mildew Avirulence Gene Alleles by *RPP1* Resistance Genes from Two *Arabidopsis* Lines. *THE PLANT CELL ONLINE* **17**, 1839–1850.
- Reusche M, Truskina J, Thole K, Nagel L, Rindfleisch S, Tran VT, Braus-Stromeier SA, Braus GH, Teichmann T, Lipka V.** 2014. Infections with the vascular pathogens *Verticillium longisporum* and *Verticillium dahliae* induce distinct disease symptoms and differentially affect drought stress tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Environmental and Experimental Botany* **108**, 23–37.
- Revilla TA, Veen GF (Ciska), Eppinga MB, Weissing FJ.** 2013. Plant–soil feedbacks and the coexistence of competing plants. *Theoretical Ecology* **6**, 99–113.
- Rey T, Laporte P, Bonhomme M, Jardinaud M-F, Huguet S, Balzergue S, Dumas B, Niebel A, Jacquet C.** 2016. MtNF-YA1, A Central Transcriptional Regulator of Symbiotic Nodule Development, Is Also a Determinant of *Medicago truncatula* Susceptibility toward a Root Pathogen. *Frontiers in Plant Science* **7**.
- Ridout CJ, Skamnioti P, Porritt O, Sacristan S, Jones JD., Brown JK.** 2006. Multiple Avirulence Paralogues in Cereal Powdery Mildew Fungi May Contribute to Parasite Fitness and Defeat of Plant Resistance. *THE PLANT CELL ONLINE* **18**, 2402–2414.
- Robert-Seilanianitz A, Grant M, Jones JDG.** 2011. Hormone Crosstalk in Plant Disease and Defense: More Than Just JASMONATE-SALICYLATE Antagonism. *Annual Review of Phytopathology* **49**, 317–343.
- Roden J, Eardley L, Hotson A, Cao Y, Mudgett MB.** 2004. Characterization of the *Xanthomonas* AvrXv4 Effector, a SUMO Protease Translocated into Plant Cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**, 633–643.
- Rogers C, Wen J, Chen R, Oldroyd G.** 2009. Deletion-Based Reverse Genetics in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* **151**, 1077–1086.
- Ron M, Avni A.** 2004. The Receptor for the Fungal Elicitor Ethylene-Inducing Xylanase Is a Member of a Resistance-Like Gene Family in Tomato. *THE PLANT CELL ONLINE* **16**, 1604–1615.
- Roncero M, Hera C, Ruiz-Rubio M, García Maceira F, Madrid M, Caracuel Z, Calero F, Delgado-Jarana J, Roldan-Rodriguez R, Martinez-Rocha A, Velasco C, Roa J, Martin-Urdiroz M, Cordoba D, Di Pietro A.** 2003. *Fusarium* as a model for studying virulence in soilborne plant pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **62**, 87–98.

- Ronfort J, Bataillon T, Santoni S, Delalande M, David JL, Prosperi J-M.** 2006. Microsatellite diversity and broad scale geographic structure in a model legume: building a set of nested core collection for studying naturally occurring variation in *Medicago truncatula*. *BMC plant biology* **6**, 28.
- Rong W, Qi L, Wang J, Du L, Xu H, Wang A, Zhang Z.** 2013. Expression of a potato antimicrobial peptide SN1 increases resistance to take-all pathogen *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in transgenic wheat. *Functional & Integrative Genomics* **13**, 403–409.
- Rooney HCE, van't Klooster JW, Joosten MHAJ, Jones JDG, deWit PJGM.** 2005. *Cladosporium* Avr2 Inhibits Tomato Rcr3 Protease Required for Cf-2-Dependent Disease Resistance. *Science* **308**, 1783–1786.
- Roux F, Voisin D, Badet T, Balagué C, Barlet X, Huard-Chauveau C, Roby D, Raffaele S.** 2014. Resistance to phytopathogens *e tutti quanti* : placing plant quantitative disease resistance on the map: Quantitative disease resistance in plants. *Molecular Plant Pathology* **15**, 427–432.
- Rovenich H, Boshoven JC, Thomma BP.** 2014. Filamentous pathogen effector functions: of pathogens, hosts and microbiomes. *SI: Biotic interactions* **20**, 96–103.
- Rubiales D, Castillejo MA, Madrid E, Barilli E, Rispaill N.** 2011. Legume breeding for rust resistance: lessons to learn from the model *Medicago truncatula*. *Euphytica* **180**, 89–98.
- Rubiales D, Fernández-Aparicio M.** 2012. Innovations in parasitic weeds management in legume crops. A review. *Agronomy for Sustainable Development* **32**, 433–449.
- Ruiz-Lozano JM, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V.** 1999. Genes involved in resistance to powdery mildew in barley differentially modulate root colonization by the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza* **9**, 237–240.
- Russelle MP.** 2001. Alfalfa: After an 8,000-year journey, the ‘Queen of Forages’ stands poised to enjoy renewed popularity. *American Scientist* **89**, 252–261.
- Ruthardt N, Fischer R, Emans N, Kawchuk LM.** 2007. Tomato protein of the resistance gene *Ve2* to verticillium wilt [*Verticillium* spp.] is located in the endoplasmic reticulum. *Canadian Journal of Plant Pathology* **29**, 3–8.
- Rutkoski JE, Poland JA, Singh RP, Huerta-Espino J, Bhavani S, Barbier H, Rouse MN, Jannink J-L, Sorrells ME.** 2014. Genomic Selection for Quantitative Adult Plant Stem Rust Resistance in Wheat. *The Plant Genome* **7**.
- Rygulla W, Snowdon RJ, Friedt W, Happstadius I, Cheung WY, Chen D.** 2008. Identification of Quantitative Trait Loci for Resistance Against *Verticillium longisporum* in Oilseed Rape (*Brassica napus*). *Phytopathology* **98**, 215–221.
- Saito K, Tautz L, Mustelin T.** 2007. The lipid-binding SEC14 domain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1771**, 719–726.
- Samac DA, Peñuela S, Schnurr JA, Hunt EN, Foster-Hartnett D, Vandenbosch K, Gantt JS.** 2011. Expression of coordinately regulated defence response genes and analysis of their role in disease resistance in *Medicago truncatula*. *Molecular Plant Pathology* **12**, 786–798.
- Sankaran RP, Huguet T, Grusak MA.** 2009. Identification of QTL affecting seed mineral concentrations and content in the model legume *Medicago truncatula*. *Theoretical and Applied Genetics* **119**, 241–253.

- Sarkar D.** 2008. *Lattice: multivariate data visualization with R*. Springer Science & Business Media.
- Sarowar S, Kim YJ, Kim EN, Kim KD, Hwang BK, Islam R, Shin JS.** 2005. Overexpression of a pepper basic *pathogenesis-related protein 1* gene in tobacco plants enhances resistance to heavy metal and pathogen stresses. *Plant Cell Reports* **24**, 216–224.
- Sarowar S, Kim YJ, Kim KD, Hwang BK, Ok SH, Shin JS.** 2009. Overexpression of lipid transfer protein (LTP) genes enhances resistance to plant pathogens and LTP functions in long-distance systemic signaling in tobacco. *Plant Cell Reports* **28**, 419–427.
- Sbeiti AAL, Mazurier M, Ben C, Rickauer M, Gentzbittel L.** soumis. Temperature increase as predicted by climate change modifies susceptibility to *Verticillium* wilt in *Medicago truncatula* and may lead to the appearance of new and more aggressive strains of the pathogen. *Planta*.
- Schaaf G, Dynowski M, Mousley CJ, Shah SD, Yuan P, Winklbauer EM, de Campos MKF, Trettin K, Quinones M-C, Smirnova TI, Yanagisawa LL, Ortlund EA, Bankaitis VA.** 2011. Resurrection of a functional phosphatidylinositol transfer protein from a pseudo-Sec14 scaffold by directed evolution (R Gilmore, Ed.). *Molecular Biology of the Cell* **22**, 892–905.
- Schaible L, Cannon O, Waddoups V.** 1951. Inheritance of resistance to *Verticillium* wilt in a tomato cross. *Phytopathology* **41**, 986–990.
- Scheer JM, Ryan CA.** 2002. The systemin receptor SR160 from *Lycopersicon peruvianum* is a member of the LRR receptor kinase family. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 9585–9590.
- van Schie CCN, Takken FLW.** 2014. Susceptibility Genes 101: How to Be a Good Host. *Annual Review of Phytopathology* **52**, 551–581.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW.** 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* **9**, 671–675.
- Schoeneweiss DF.** 1975. Predisposition, Stress, and Plant Disease. *Annual Review of Phytopathology* **13**, 193–211.
- Schultheiss H, Dechert C, Kogel K-H, Hüchelhoven R.** 2002. A Small GTP-Binding Host Protein Is Required for Entry of Powdery Mildew Fungus into Epidermal Cells of Barley. *Plant Physiology* **128**, 1447.
- Schulze B, Mentzel T, Jehle AK, Mueller K, Beeler S, Boller T, Felix G, Chinchilla D.** 2010. Rapid Heteromerization and Phosphorylation of Ligand-activated Plant Transmembrane Receptors and Their Associated Kinase BAK1. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 9444–9451.
- Schwab R.** 2005. Cloning of artificial microRNAs.
- Senthil-Kumar M, Mysore KS.** 2013. Nonhost Resistance Against Bacterial Pathogens: Retrospectives and Prospects. *Annual Review of Phytopathology* **51**, 407–427.
- Serazetdinova L, Oldach KH, Lörz H.** 2005. Expression of transgenic stilbene synthases in wheat causes the accumulation of unknown stilbene derivatives with antifungal activity. *Journal of Plant Physiology* **162**, 985–1002.
- Sewell GWF, Wilson JF.** 1966. *Verticillium* wilt of the hop: the survival of *V. albo-atrum* in soil. *Annals of Applied Biology* **58**, 241–249.
- Shanks JV, Morgan J.** 1999. Plant ‘hairy root’ culture. *Current Opinion in Biotechnology* **10**, 151–155.

- Sharma PC, Ito A, Shimizu T, Terauchi R, Kamoun S, Saitoh H.** 2003. Virus-induced silencing of WIPK and SIPK genes reduces resistance to a bacterial pathogen, but has no effect on the INF1-induced hypersensitive response (HR) in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Genetics and Genomics* **269**, 583–591.
- Shetty KG, Subbarao KV, Huisman OC, Hubbard JC.** 2000. Mechanism of Broccoli-Mediated Verticillium Wilt Reduction in Cauliflower. *Phytopathology* **90**, 305–310.
- Shi J, Zhang L, An H, Wu C, Guo X.** 2011. GhMPK16, a novel stress-responsive group D MAPK gene from cotton, is involved in disease resistance and drought sensitivity. *BMC Molecular Biology* **12**, 22.
- Shi Y, Zhang B, Liu A, Li W, Li J, Lu Q, Zhang Z, Li S, Gong W, Shang H, Gong J, Chen T, Ge Q, Wang T, Zhu H, Liu Z, Yuan Y.** 2016. Quantitative trait loci analysis of Verticillium wilt resistance in interspecific backcross populations of *Gossypium hirsutum* × *Gossypium barbadense*. *BMC Genomics* **17**, 877.
- Shimizu T, Nakano T, Takamizawa D, Desaki Y, Ishii-Minami N, Nishizawa Y, Minami E, Okada K, Yamane H, Kaku H, Shibuya N.** 2010. Two LysM receptor molecules, CEBiP and OsCERK1, cooperatively regulate chitin elicitor signaling in rice: LysM receptors for rice chitin signaling. *The Plant Journal* **64**, 204–214.
- Simko I, Costanzo S, Haynes KG, Christ BJ, Jones RW.** 2004. Linkage disequilibrium mapping of a *Verticillium dahliae* resistance quantitative trait locus in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) through a candidate gene approach. *TAG Theoretical and Applied Genetics* **108**, 217–224.
- Singh AK, Dwivedi V, Rai A, Pal S, Reddy SGE, Rao DKV, Shasany AK, Nagegowda DA.** 2015. Virus-induced gene silencing of *Withania somnifera* squalene synthase negatively regulates sterol and defence-related genes resulting in reduced withanolides and biotic stress tolerance. *Plant Biotechnology Journal* **13**, 1287–1299.
- Singh R, Hodson DP, Jin Y, Huerta-Espino J, Kinyua MG, Wanyera R, Njau P, Ward RW.** 2006. Current status, likely migration and strategies to mitigate the threat to wheat production from race Ug99 (TTKS) of stem rust pathogen. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* **1**.
- Slootweg E, Roosien J, Spiridon LN, Petrescu A-J, Tameling W, Joosten M, Pomp R, van Schaik C, Dees R, Borst JW, Smant G, Schots A, Bakker J, Goverse A.** 2010. Nucleocytoplasmic Distribution Is Required for Activation of Resistance by the Potato NB-LRR Receptor Rx1 and Is Balanced by Its Functional Domains. *The Plant Cell* **22**, 4195–4215.
- Snapp E.** 2005. Design and Use of Fluorescent Fusion Proteins in Cell Biology. In: Bonifacino JS,, In: Dasso M,, In: Harford JB,, In: Lippincott-Schwartz J,, In: Yamada KM, eds. *Current Protocols in Cell Biology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., .
- Song WY, Wang GL, Chen LL, Kim HS, Pi LY, Holsten T, Gardner J, Wang B, Zhai WX, Zhu LH, Fauquet C, Ronald P.** 1995. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. *Science (New York, N.Y.)* **270**, 1804–1806.
- Sosa-Valencia G, Romero-Pérez PS, Palomar VM, Covarrubias AA, Reyes JL.** 2017a. Insights into the function of the phasiRNA-triggering miR1514 in response to stress in legumes. *Plant Signaling & Behavior* **12**, e1284724.
- Sosa-Valencia G, Palomar M, Covarrubias AA, Reyes JL.** 2017b. The legume miR1514a modulates a NAC transcription factor transcript to trigger phasiRNA formation in response to drought. *Journal of Experimental Botany* **68**, 2013–2026.

- Spanu PD, Abbott JC, Amselem J, Burgis TA, Soanes DM, Stüber K, *et al.*** 2010. Genome Expansion and Gene Loss in Powdery Mildew Fungi Reveal Tradeoffs in Extreme Parasitism. *Science* **330**, 1543.
- Stanton-Geddes J, Paape T, Epstein B, Briskine R, Yoder J, Mudge J, Bharti AK, Farmer AD, Zhou P, Denny R, May GD, Erlandson S, Yakub M, Sugawara M, Sadowsky MJ, Young ND, Tiffin P.** 2013. Candidate Genes and Genetic Architecture of Symbiotic and Agronomic Traits Revealed by Whole-Genome, Sequence-Based Association Genetics in *Medicago truncatula* (L Lukens, Ed.). *PLoS ONE* **8**, e65688.
- St.Clair DA.** 2010. Quantitative Disease Resistance and Quantitative Resistance Loci in Breeding. *Annual Review of Phytopathology* **48**, 247–268.
- Stewart SA, Hodge S, Ismail N, Mansfield JW, Feys BJ, Prospéri J-M, Huguet T, Ben C, Gentzbittel L, Powell G.** 2009. The *RAP1* Gene Confers Effective, Race-Specific Resistance to the Pea Aphid in *Medicago truncatula* Independent of the Hypersensitive Reaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**, 1645–1655.
- Sturrock RN, Frankel SJ, Brown AV, Hennon PE, Kliejunas JT, Lewis KJ, Worrall JJ, Woods AJ.** 2011. Climate change and forest diseases. *Plant Pathology* **60**, 133–149.
- Sun X, Cao Y, Yang Z, Xu C, Li X, Wang S, Zhang Q.** 2004. *Xa26*, a gene conferring resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice, encodes an LRR receptor kinase-like protein: *Rice bacterial blight disease resistance gene*. *The Plant Journal* **37**, 517–527.
- Tada Y, Spoel SH, Pajerowska-Mukhtar K, Mou Z, Song J, Wang C, Zuo J, Dong X.** 2008. Plant Immunity Requires Conformational Charges of NPR1 via S-Nitrosylation and Thioredoxins. *Science (New York, N.Y.)* **321**, 10.1126/science.1156970.
- Tadege M, Ratet P, Mysore KS.** 2005. Insertional mutagenesis: a Swiss Army knife for functional genomics of *Medicago truncatula*. *Special Issue: Plant model systems* **10**, 229–235.
- Tadege M, Wen J, He J, Tu H, Kwak Y, Eschstruth A, Cayrel A, Endre G, Zhao PX, Chabaud M, Ratet P, Mysore KS.** 2008. Large-scale insertional mutagenesis using the *Tnt1* retrotransposon in the model legume *Medicago truncatula*. *The Plant Journal* **54**, 335–347.
- Taguchi F, Ogawa Y, Takeuchi K, Suzuki T, Toyoda K, Shiraishi T, Ichinose Y.** 2006. A Homologue of the 3-Oxoacyl-(Acyl Carrier Protein) Synthase III Gene Located in the Glycosylation Island of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* Regulates Virulence Factors via N-Acyl Homoserine Lactone and Fatty Acid Synthesis. *Journal of Bacteriology* **188**, 8376–8384.
- Taguchi F, Suzuki T, Inagaki Y, Toyoda K, Shiraishi T, Ichinose Y.** 2010. The Siderophore Pyoverdine of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605 Is an Intrinsic Virulence Factor in Host Tobacco Infection. *Journal of Bacteriology* **192**, 117–126.
- Takken FLW, Tameling WIL.** 2009. To Nibble at Plant Resistance Proteins. *Science* **324**, 744–746.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S.** 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**, 2725–2729.
- Tang C, Deng L, Chang D, Chen S, Wang X, Kang Z.** 2016. TaADF3, an Actin-Depolymerizing Factor, Negatively Modulates Wheat Resistance Against *Puccinia striiformis*. *Frontiers in Plant Science* **6**, 1214.
- Tang H, Krishnakumar V, Bidwell S, Rosen B, Chan A, Zhou S, Gentzbittel L, Childs KL, Yandell M, Gundlach H, Mayer KF, Schwartz DC, Town CD.** 2014. An improved genome release (version Mt4.0) for the model legume *Medicago truncatula*. *BMC Genomics* **15**, 312.

- Taniguchi S, Hosokawa-Shinonaga Y, Tamaoki D, Yamada S, Akimitsu K, Gomi K.** 2014. Jasmonate induction of the monoterpene linalool confers resistance to rice bacterial blight and its biosynthesis is regulated by JAZ protein in rice: Role of volatile on jasmonate-induced resistance. *Plant, Cell & Environment* **37**, 451–461.
- Tayeh N, Bahrman N, Devaux R, Bluteau A, Prosperi J-M, Delbreil B, Lejeune-Hénaut I.** 2013. A high-density genetic map of the *Medicago truncatula* major freezing tolerance QTL on chromosome 6 reveals colinearity with a QTL related to freezing damage on *Pisum sativum* linkage group VI. *Molecular Breeding* **32**, 279–289.
- Technow F, Bürger A, Melchinger AE.** 2013. Genomic Prediction of Northern Corn Leaf Blight Resistance in Maize with Combined or Separated Training Sets for Heterotic Groups. *G3: Genes | Genomes | Genetics* **3**, 197–203.
- Teng Y, Wang X, Li L, Li Z, Luo Y.** 2015. Rhizobia and their bio-partners as novel drivers for functional remediation in contaminated soils. *Frontiers in Plant Science* **6**, 32.
- Thatcher LF, Williams AH, Garg G, Buck S-AG, Singh KB.** 2016. Transcriptome analysis of the fungal pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis* during colonisation of resistant and susceptible *Medicago truncatula* hosts identifies differential pathogenicity profiles and novel candidate effectors. *BMC Genomics* **17**, 860.
- Thomas D.** 2010. Gene-environment-wide association studies: emerging approaches. *Nature Reviews Genetics* **11**, 259–272.
- Thomas MR, Rose RJ, Nolan KE.** 1992. Genetic transformation of *Medicago truncatula* using *Agrobacterium* with genetically modified Ri and disarmed Ti plasmids. *Plant Cell Reports* **11**, 113–117.
- Thomma BPHJ, Nürnberger T, Joosten MHAJ.** 2011. Of PAMPs and Effectors: The Blurred PTI-ETI Dichotomy. *The Plant Cell* **23**, 4–15.
- Thoquet P, Ghérardi M, Journet E-P, Kereszt A, Ané J-M, Prosperi J-M, Huguet T.** 2002. The molecular genetic linkage map of the model legume *Medicago truncatula*: an essential tool for comparative legume genomics and the isolation of agronomically important genes. *BMC Plant Biology* **2**, 1.
- Thrall PH, Antonovics J, Hall DW.** 1993. Host and Pathogen Coexistence in Sexually Transmitted and Vector-Borne Diseases Characterized by Frequency-Dependent Disease Transmission. *The American Naturalist* **142**, 543–552.
- Tian F, Bradbury PJ, Brown PJ, Hung H, Sun Q, Flint-Garcia S, Rocheford TR, McMullen MD, Holland JB, Buckler ES.** 2011. Genome-wide association study of leaf architecture in the maize nested association mapping population. *Nature Genetics* **43**, 159–162.
- Tian M, Chaudhry F, Ruzicka DR, Meagher RB, Staiger CJ, Day B.** 2009. *Arabidopsis* Actin-Depolymerizing Factor AtADF4 Mediates Defense Signal Transduction Triggered by the *Pseudomonas syringae* Effector AvrPphB. *Plant Physiology* **150**, 815.
- Tivoli B, Baranger A, Sivasithamparam K, Barbetti MJ.** 2006. Annual *Medicago*: From a Model Crop Challenged by a Spectrum of Necrotrophic Pathogens to a Model Plant to Explore the Nature of Disease Resistance. *Annals of Botany* **98**, 1117–1128.
- Todesco M, Balasubramanian S, Hu TT, Traw MB, Horton M, Eppele P, Kuhns C, Sureshkumar S, Schwartz C, Lanz C, Laitinen RAE, Huang Y, Chory J, Lipka V, Borevitz JO, Dangl JL, Bergelson J, Nordborg M, Weigel D.** 2010. Natural allelic variation underlying a major fitness trade-off in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **465**, 632–636.

- Toueni M.** 2014. Étude de l'interaction entre *Verticillium alfalfae* et *Medicago truncatula*.
- Toueni M, Ben C, Le Ru A, Gentzbittel L, Rickauer M.** 2016. Quantitative Resistance to Verticillium Wilt in *Medicago truncatula* Involves Eradication of the Fungus from Roots and Is Associated with Transcriptional Responses Related to Innate Immunity. *Frontiers in Plant Science* **7**.
- Trépanier M, Bécard G, Moutoglis P, Willemot C, Gagné S, Avis TJ, Rioux J-A.** 2005. Dependence of Arbuscular-Mycorrhizal Fungi on Their Plant Host for Palmitic Acid Synthesis. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 5341–5347.
- Trinh TH, Ratet P, Kondorosi E, Durand P, Kamaté; K, Bauer P, Kondorosi A.** 1998. Rapid and efficient transformation of diploid *Medicago truncatula* and *Medicago sativa* ssp. *falcata* lines improved in somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports* **17**, 345–355.
- Tronchet M, Balaguá C, Kroj T, Jouanin L, Roby D.** 2010. Cinnamyl alcohol dehydrogenases-C and D, key enzymes in lignin biosynthesis, play an essential role in disease resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant Pathology* **11**, 83–92.
- Trujillo DI, Silverstein KAT, Young ND.** 2014. Genomic Characterization of the LEED..PEEDs, a Gene Family Unique to the *Medicago* Lineage. *G3: Genes|Genomes|Genetics* **4**, 2003–2012.
- Tsujimoto Y, Numaga T, Ohshima K, Yano M, Ohsawa R, Goto DB, Naito S, Ishikawa M.** 2003. *Arabidopsis* TOBAMOVIRUS MULTIPLICATION (TOM) 2 locus encodes a transmembrane protein that interacts with TOM1. *The EMBO Journal* **22**, 335.
- Uemura T, Kim H, Saito C, Ebine K, Ueda T, Schulze-Lefert P, Nakano A.** 2012. Qa-SNAREs localized to the trans-Golgi network regulate multiple transport pathways and extracellular disease resistance in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 1784–1789.
- Umemura K, Ogawa N, Koga J, Iwata M, Usami H.** 2002. Elicitor activity of cerebroside, a sphingolipid elicitor, in cell suspension cultures of rice. *Plant & Cell Physiology* **43**, 778–784.
- Underwood W, Zhang S, He SY.** 2007. The *Pseudomonas syringae* type III effector tyrosine phosphatase HopAO1 suppresses innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: Virulence action of *Pst* DC3000 effector HopAO1. *The Plant Journal* **52**, 658–672.
- Underwood W, Somerville SC.** 2013. Perception of conserved pathogen elicitors at the plasma membrane leads to relocalization of the *Arabidopsis* PEN3 transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 12492–12497.
- Underwood W.** 2016. Contributions of host cellular trafficking and organization to the outcomes of plant-pathogen interactions. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **56**, 163–173.
- Upchurch RG.** 2008. Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. *Biotechnology Letters* **30**, 967–977.
- Uppalapati SR, Ishiga Y, Doraiswamy V, Bedair M, Mittal S, Chen J, Nakashima J, Tang Y, Tadege M, Ratet P, Chen R, Schultheiss H, Mysore KS.** 2012. Loss of Abaxial Leaf Epicuticular Wax in *Medicago truncatula* *irg1/palm1* Mutants Results in Reduced Spore Differentiation of Anthracnose and Nonhost Rust Pathogens. *The Plant Cell* **24**, 353.
- Urbański DF, Małolepszy A, Stougaard J, Andersen SU.** 2012. Genome-wide *LORE1* retrotransposon mutagenesis and high-throughput insertion detection in *Lotus japonicus*: FST poolit detection of *LORE1* insertions. *The Plant Journal* **69**, 731–741.

- Vailleau F, Sartorel E, Jardinaud M-F, Chardon F, Genin S, Huguet T, Gentzbittel L, Petitprez M.** 2007. Characterization of the Interaction Between the Bacterial Wilt Pathogen *Ralstonia solanacearum* and the Model Legume Plant *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**, 159–167.
- Vallad GE, Bhat RG, Koike ST, Ryder EJ, Subbarao KV.** 2005. Weedborne Reservoirs and Seed Transmission of *Verticillium dahliae* in Lettuce. *Plant Disease* **89**, 317–324.
- Van der Putten WH, Peters BAM.** 1997. HOW SOIL-BORNE PATHOGENS MAY AFFECT PLANT COMPETITION. *Ecology* **78**, 1785–1795.
- Vandecasteele C, Teulat-Merah B, Morère-le Paven MC, Leprince O, Ly Vu B, Viau L, Ledroit L, Pelletier S, Payet N, Satour P, Lebras C, Gallardo K, Huguet T, Limami AM, Prosperi JM, Buitink J.** 2011. Quantitative trait loci analysis reveals a correlation between the ratio of sucrose/raffinose family oligosaccharides and seed vigour in *Medicago truncatula*. *Plant, Cell & Environment* **34**, 1473–1487.
- VanEtten HD.** 1994. Two Classes of Plant Antibiotics: Phytoalexins versus ‘Phytoanticipins’. *THE PLANT CELL ONLINE* **6**, 1191–1192.
- Várallyay É, Giczey G, Burgyán J.** 2012. Virus-induced gene silencing of *Mlo* genes induces powdery mildew resistance in *Triticum aestivum*. *Archives of Virology* **157**, 1345–1350.
- Varma A, Savita Verma, Sudha, Sahay N, Bütehorn B, Franken P.** 1999. *Piriformospora indica*, a Cultivable Plant-Growth-Promoting Root Endophyte. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 2741–2744.
- Veronese P, Narasimhan ML, Stevenson RA, Zhu J-K, Weller SC, Subbarao KV, Bressan RA.** 2003. Identification of a locus controlling *Verticillium* disease symptom response in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **35**, 574–587.
- Verwijst T.** 1993. Influence of the Pathogen *Melampsora epitea* on Intraspecific Competition in a Mixture of *Salix viminalis* Clones. *Journal of Vegetation Science* **4**, 717–722.
- Vetter MM, Kronholm I, He F, Häweker H, Reymond M, Bergelson J, Robatzek S, de Meaux J.** 2012. Flagellin Perception Varies Quantitatively in *Arabidopsis thaliana* and Its Relatives. *Molecular Biology and Evolution* **29**, 1655–1667.
- Vicente JG, Conway J, Roberts SJ, Taylor JD.** 2001. Identification and Origin of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Races and Related Pathovars. *Phytopathology* **91**, 492–499.
- Vilhjálmsón BJ, Nordborg M.** 2012. The nature of confounding in genome-wide association studies. *Nature Reviews Genetics* **14**, 1–2.
- Vincent P, Chua M, Nogue F, Fairbrother A, Mekeel H, Xu Y, Allen N, Bibikova TN, Gilroy S, Bankaitis VA.** 2005. A Sec14p-nodulin domain phosphatidylinositol transfer protein polarizes membrane growth of *Arabidopsis thaliana* root hairs. *The Journal of Cell Biology* **168**, 801–812.
- Vogel JP, Raab TK, Schiff C, Somerville SC.** 2002. *PMR6*, a Pectate Lyase–Like Gene Required for Powdery Mildew Susceptibility in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **14**, 2095.
- Voisin A-S, Guéguen J, Huyghe C, Jeuffroy M-H, Magrini M-B, Meynard J-M, Mougél C, Pellerin S, Pelzer E.** 2014. Legumes for feed, food, biomaterials and bioenergy in Europe: a review. *Agronomy for Sustainable Development* **34**, 361–380.

- Vu WT, Chang PL, Moriuchi KS, Friesen ML.** 2015. Genetic variation of transgenerational plasticity of offspring germination in response to salinity stress and the seed transcriptome of *Medicago truncatula*. *BMC Evolutionary Biology* **15**.
- Walley JW, Kliebenstein DJ, Bostock RM, Dehesh K.** 2013. Fatty acids and early detection of pathogens. *Current Opinion in Plant Biology* **16**, 520–526.
- Wan J, Zhang X-C, Neece D, Ramonell KM, Clough S, Kim S -y., Stacey MG, Stacey G.** 2008. A LysM Receptor-Like Kinase Plays a Critical Role in Chitin Signaling and Fungal Resistance in Arabidopsis. *THE PLANT CELL ONLINE* **20**, 471–481.
- Wang C, Chin C-K, Chen A.** 1998. Expression of the yeast Δ -9 desaturase gene in tomato enhances its resistance to powdery mildew. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **52**, 371–383.
- Wang E, Schornack S, Marsh JF, Gobbato E, Schwessinger B, Eastmond P, Schultze M, Kamoun S, Oldroyd GED.** 2012a. A Common Signaling Process that Promotes Mycorrhizal and Oomycete Colonization of Plants. *Current Biology* **22**, 2242–2246.
- Wang H, Hao J, Chen X, Hao Z, Wang X, Lou Y, Peng Y, Guo Z.** 2007a. Overexpression of rice WRKY89 enhances ultraviolet B tolerance and disease resistance in rice plants. *Plant Molecular Biology* **65**, 799–815.
- Wang L, Wang Y, Wang Z, Marcel TC, Niks RE, Qi X.** 2010. The phenotypic expression of QTLs for partial resistance to barley leaf rust during plant development. *Theoretical and Applied Genetics* **121**, 857–864.
- Wang W, Wen Y, Berkey R, Xiao S.** 2009. Specific Targeting of the *Arabidopsis* Resistance Protein RPW8.2 to the Interfacial Membrane Encasing the Fungal Haustorium Renders Broad-Spectrum Resistance to Powdery Mildew. *THE PLANT CELL ONLINE* **21**, 2898–2913.
- Wang W, Sun Y, Han L, Su L, Xia G, Wang H.** 2017. Overexpression of *GhPFN2* enhances protection against *Verticillium dahliae* invasion in cotton. *Science China Life Sciences* **60**, 861–867.
- Wang W-M, Liu P-Q, Xu Y-J, Xiao S.** 2016a. Protein trafficking during plant innate immunity: Protein trafficking during plant innate immunity. *Journal of Integrative Plant Biology* **58**, 284–298.
- Wang X, Tang C, Huang X, Li F, Chen X, Zhang G, Sun Y, Han D, Kang Z.** 2012b. Wheat BAX inhibitor-1 contributes to wheat resistance to *Puccinia striiformis*. *Journal of Experimental Botany* **63**, 4571–4584.
- Wang X, Wang X, Deng L, Chang H, Dubcovsky J, Feng H, Han Q, Huang L, Kang Z.** 2014a. Wheat TaNPSN SNARE homologues are involved in vesicle-mediated resistance to stripe rust (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*). *Journal of Experimental Botany* **65**, 4807–4820.
- Wang X, Shan X, Xue C, Wu Y, Su S, Li S, Liu H, Jiang Y, Zhang Y, Yuan Y.** 2016b. Isolation and functional characterization of a cold responsive phosphatidylinositol transfer-associated protein, ZmSEC14p, from maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Reports* **35**, 1671–1686.
- Wang Y, Bi B, Yuan QH, Li XL, Gao JM.** 2012c. Association of AFLP and SCAR markers with common leafspot resistance in autotetraploid alfalfa (*Medicago sativa*). *Genetics and Molecular Research* **11**, 606–616.
- Wang Y, Cheng X, Shan Q, Zhang Y, Liu J, Gao C, Qiu J-L.** 2014b. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nature Biotechnology* **32**, 947.

- Wang Y-S, Pi L-Y, Chen X, Chakrabarty PK, Jiang J, De Leon AL, Liu G-Z, Li L, Benny U, Oard J, Ronald PC, Song W-Y.** 2007b. Rice XA21 Binding Protein 3 Is a Ubiquitin Ligase Required for Full Xa21-Mediated Disease Resistance. *The Plant Cell* **18**, 3635.
- Wang Z-Y.** 2012. Brassinosteroids modulate plant immunity at multiple levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 7–8.
- Wilhelm S.** 1955. Longevity of the *Verticillium* wilt fungus in the laboratory and in the field. **45**, 180–181.
- Willmann R, Lajunen HM, Erbs G, Newman M-A, Kolb D, Tsuda K, Katagiri F, Fliegmann J, Bono J-J, Cullimore JV, Jehle AK, Gotz F, Kulik A, Molinaro A, Lipka V, Gust AA, Nurnberger T.** 2011. *Arabidopsis* lysin-motif proteins LYM1 LYM3 CERK1 mediate bacterial peptidoglycan sensing and immunity to bacterial infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 19824–19829.
- Wilton M, Subramaniam R, Elmore J, Felsensteiner C, Coaker G, Desveaux D.** 2010. The type III effector HopF2 Pto targets *Arabidopsis* RIN4 protein to promote *Pseudomonas syringae* virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 2349–2354.
- Wirthmueller L, Zhang Y, Jones JDG, Parker JE.** 2007. Nuclear Accumulation of the *Arabidopsis* Immune Receptor RPS4 Is Necessary for Triggering EDS1-Dependent Defense. *Current Biology* **17**, 2023–2029.
- Wright DSC.** 1968. *Verticillium* wilt of tobacco: VIII. Movement of conidia of *Verticillium dahliae* Kleb. in tobacco plants. *New Zealand Journal of Agricultural Research* **11**, 803–811.
- Wu W, Cheng Z, Liu M, Yang X, Qiu D.** 2014. C3HC4-Type RING Finger Protein NbZFP1 Is Involved in Growth and Fruit Development in *Nicotiana benthamiana* (M Massiah, Ed.). *PLoS ONE* **9**, e99352.
- Xia N, Zhang G, Liu X-Y, Deng L, Cai G-L, Zhang Y, Wang X-J, Zhao J, Huang L-L, Kang Z-S.** 2010. Characterization of a novel wheat NAC transcription factor gene involved in defense response against stripe rust pathogen infection and abiotic stresses. *Molecular Biology Reports* **37**, 3703–3712.
- Xiao J, Zhou Y, Lai H, Lei S, Chi LH, Mo X.** 2013. Transcription Factor NF-Y Is a Functional Regulator of the Transcription of Core Clock Gene *Bmal1*. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 31930–31936.
- Xing J, Chin C-K.** 2000. Modification of fatty acids in eggplant affects its resistance to *Verticillium dahliae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **56**, 217–225.
- Xiong L, Yang Y.** 2003. Disease Resistance and Abiotic Stress Tolerance in Rice Are Inversely Modulated by an Abscissic Acid-Inducible Mitogen-Activated Protein Kinase. *The Plant Cell* **15**, 745.
- Xu J, Wang G, Wang J, Li Y, Tian L, Wang X, Guo W.** 2017. The lysin motif-containing proteins, Lyp1, Lyk7 and LysMe3, play important roles in chitin perception and defense against *Verticillium dahliae* in cotton. *BMC Plant Biology* **17**, 148.
- Xu Y-H, Wang J-W, Wang S, Wang J-Y, Chen X-Y.** 2004. Characterization of *GaWRKY1*, a cotton transcription factor that regulates the sesquiterpene synthase gene (+)-delta-cadinene synthase-A. *Plant Physiology* **135**, 507–515.
- Yadeta KA, Thomma BPH.** 2013. The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. *Frontiers in Plant Science* **4**.
- Yaeger JR, Stuteville DL.** 2000. Reactions in the Annual *Medicago* Core Germ Plasm Collection to Two Isolates of *Peronospora trifoliorum* from Alfalfa. *Plant Disease* **84**, 521–524.

- Yamanaka T, Ohta T, Takahashi M, Meshi T, Schmidt R, Dean C, Naito S, Ishikawa M.** 2000. *TOM1*, an *Arabidopsis* gene required for efficient multiplication of a tobamovirus, encodes a putative transmembrane protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 10107–10112.
- Yamanaka T, Imai T, Satoh R, Kawashima A, Takahashi M, Tomita K, Kubota K, Meshi T, Naito S, Ishikawa M.** 2002. Complete Inhibition of Tobamovirus Multiplication by Simultaneous Mutations in Two Homologous Host Genes. *Journal of Virology* **76**, 2491–2497.
- Yamchi A, Ben C, Rossignol M, Zareie SR, Mirlohi A, Sayed-Tabatabaei BE, Pichereaux C, Sarrafi A, Rickauer M, Gentzbittel L.** 2018. Proteomics analysis of *Medicago truncatula* response to infection by the phytopathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum* points to jasmonate and salicylate defence pathways. *Cellular Microbiology*, e12796-n/a.
- Yang L, Qin L, Liu G, Peremyslov VV, Dolja VV, Wei Y.** 2014. Myosins XI modulate host cellular responses and penetration resistance to fungal pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 13996–14001.
- Yang Q, He Y, Kabahuma M, Chaya T, Kelly A, Borrego E, Bian Y, El Kasmi F, Yang L, Teixeira P, Kolkman J, Nelson R, Kolomiets M, L Dangl J, Wissner R, Caplan J, Li X, Lauter N, Balint-Kurti P.** 2017. A gene encoding maize caffeoyl-CoA O-methyltransferase confers quantitative resistance to multiple pathogens. *Nature Genetics* **49**, 1364–1372.
- Yang S, Gao M, Deshpande S, Lin S, Roe BA, Zhu H.** 2007. Genetic and physical localization of an anthracnose resistance gene in *Medicago truncatula*. *Theoretical and Applied Genetics* **116**, 45–52.
- Yang S, Gao M, Xu C, Gao J, Deshpande S, Lin S, Roe BA, Zhu H.** 2008. Alfalfa benefits from *Medicago truncatula*: The *RCT1* gene from *M. truncatula* confers broad-spectrum resistance to anthracnose in alfalfa. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 12164–12169.
- Yang Y, Ling X, Chen T, Cai L, Liu T, Wang J, Fan X, Ren Y, Yuan H, Zhu W, Zhang B, Ma D-P.** 2015. A Cotton *Gbvdr5* Gene Encoding a Leucine-Rich-Repeat Receptor-Like Protein Confers Resistance to *Verticillium dahliae* in Transgenic *Arabidopsis* and Upland Cotton. *Plant Molecular Biology Reporter* **33**, 987–1001.
- Yang Y, Chen T, Ling X, Ma Z.** 2018. *Gbvdr6*, a Gene Encoding a Receptor-Like Protein of Cotton (*Gossypium barbadense*), Confers Resistance to Verticillium Wilt in *Arabidopsis* and Upland Cotton. *Frontiers in Plant Science* **8**, 2272.
- Yasuda N, Mitsunaga T, Hayashi K, Koizumi S, Fujita Y.** 2015. Effects of Pyramiding Quantitative Resistance Genes *pi21*, *Pi34*, and *Pi35* on Rice Leaf Blast Disease. *Plant Disease* **99**, 904–909.
- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL.** 2012. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* **13**, 134.
- Yeh Y-H, Chang Y-H, Huang P-Y, Huang J-B, Zimmerli L.** 2015. Enhanced *Arabidopsis* pattern-triggered immunity by overexpression of cysteine-rich receptor-like kinases. *Frontiers in Plant Science* **6**.
- Yoder JB, Stanton-Geddes J, Zhou P, Briskine R, Young ND, Tiffin P.** 2014. Genomic Signature of Adaptation to Climate in *Medicago truncatula*. *Genetics*.
- Yogendra KN, Pushpa D, Mosa KA, Kushalappa AC, Murphy A, Mosquera T.** 2014. Quantitative resistance in potato leaves to late blight associated with induced hydroxycinnamic acid amides. *Functional & Integrative Genomics* **14**, 285–298.

- Yogendra KN, Kushalappa AC, Sarmiento F, Rodriguez E, Mosquera T.** 2015. Metabolomics deciphers quantitative resistance mechanisms in diploid potato clones against late blight. *Functional Plant Biology* **42**, 284–298.
- Young N, Mudge J, Ellis TH.** 2003. Legume genomes: more than peas in a pod. *Curr Opin Plant Biol* **6**.
- Young ND, Debellé F, Oldroyd GED, Geurts R, Cannon SB, Udvardi MK, et al.** 2011. The *Medicago* genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. *Nature*.
- Youssef C, Aubry C, Montrichard F, Beucher D, Juchaux M, Ben C, Prosperi J-M, Teulat B.** 2016. Cell length instead of cell number becomes the predominant factor contributing to hypocotyl length genotypic differences under abiotic stress in *Medicago truncatula*. *Physiologia Plantarum* **156**, 108–124.
- Yu G, Smith DK, Zhu H, Guan Y, Lam TT-Y.** 2017a. ggtree: an r package for visualization and annotation of phylogenetic trees with their covariates and other associated data. *Methods in Ecology and Evolution* **8**, 28–36.
- Yu L-X, Zheng P, Zhang T, Rodringuez J, Main D.** 2016. Genotyping-by-sequencing based genome-wide association studies on Verticillium wilt resistance in autotetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.): Association mapping of Verticillium wilt resistance in alfalfa. *Molecular Plant Pathology*, n/a-n/a.
- Yu L-X, Zheng P, Bhamidimarri S, Liu X-P, Main D.** 2017b. The Impact of Genotyping-by-Sequencing Pipelines on SNP Discovery and Identification of Markers Associated with Verticillium Wilt Resistance in Autotetraploid Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Frontiers in Plant Science* **8**.
- Yuego H, Cash D.** 2009. Global Status and Development Trends of Alfalfa. Alfalfa management guide for Ningxia. United Nations Food and Agriculture Organization.
- Yun B-W, Feechan A, Yin M, Saidi NBB, Le Bihan T, Yu M, Moore JW, Kang J-G, Kwon E, Spoel SH, Pallas JA, Loake GJ.** 2011. S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. *Nature*, 264–268.
- Zapata JM, Martínez-García V, Lefebvre S.** 2007. Phylogeny of the TRAF/MATH domain. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **597**, 1–24.
- Zeng W, He SY.** 2010. A Prominent Role of the Flagellin Receptor FLAGELLIN-SENSING2 in Mediating Stomatal Response to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 in *Arabidopsis*. *PLANT PHYSIOLOGY* **153**, 1188–1198.
- Zettl M, Adrain C, Strisovsky K, Lastun V, Freeman M.** 2011. Rhomboid Family Pseudoproteases Use the ER Quality Control Machinery to Regulate Intercellular Signaling. *Cell* **145**, 79–91.
- Zhang B, Yang Y, Chen T, Yu W, Liu T, Li H, Fan X, Ren Y, Shen D, Liu L, Dou D, Chang Y.** 2012. Island Cotton *Gbve1* Gene Encoding A Receptor-Like Protein Confers Resistance to Both Defoliating and Non-Defoliating Isolates of *Verticillium dahliae* (B Zhang, Ed.). *PLoS ONE* **7**, e51091.
- Zhang F, Huang L-Y, Zhang F, Ali J, Cruz C, Zhuo D-L, Du Z-L, Li Z, Zhou Y-L.** 2015a. Comparative transcriptome profiling of a rice line carrying *Xa39* and its parents triggered by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* provides novel insights into the broad-spectrum hypersensitive response. *BMC Genomics* **16**, 111.
- Zhang H, Hu Y, Yang B, Xue F, Wang C, Kang Z, Ji W.** 2013a. Isolation and characterization of a wheat *IF2* homolog required for innate immunity to stripe rust. *Plant Cell Reports* **32**, 591–600.

- Zhang J, Shao F, Li Y, Cui H, Chen L, Li H, Zou Y, Long C, Lan L, Chai J, Chen S, Tang X, Zhou J-M.** 2007. A *Pseudomonas syringae* Effector Inactivates MAPKs to Suppress PAMP-Induced Immunity in Plants. *Cell Host & Microbe* **1**, 175–185.
- Zhang J, Peng Y, Guo Z.** 2008. Constitutive expression of pathogen-inducible *OsWRKY31* enhances disease resistance and affects root growth and auxin response in transgenic rice plants. *Cell Research* **18**, 508–521.
- Zhang J, Li W, Xiang T, Liu Z, Laluk K, Ding X, Zou Y, Gao M, Zhang X, Chen S, Mengiste T, Zhang Y, Zhou J-M.** 2010. Receptor-like Cytoplasmic Kinases Integrate Signaling from Multiple Plant Immune Receptors and Are Targeted by a *Pseudomonas syringae* Effector. *Cell Host & Microbe* **7**, 290–301.
- Zhang J, Singh A, Mueller DS, Singh AK.** 2015b. Genome-wide association and epistasis studies unravel the genetic architecture of sudden death syndrome resistance in soybean. *The Plant Journal* **84**, 1124–1136.
- Zhang T, Yu L-X, McCord P, Miller D, Bhamidimarri S, Johnson D, Monteros MJ, Ho J, Reisen P, Samac DA.** 2014. Identification of Molecular Markers Associated with Verticillium Wilt Resistance in Alfalfa (*Medicago Sativa* L.) Using High-Resolution Melting (X Zhang, Ed.). *PLoS ONE* **9**, e115953.
- Zhang W, Zhang H, Qi F, Jian G.** 2016. Generation of transcriptome profiling and gene functional analysis in *Gossypium hirsutum* upon *Verticillium dahliae* infection. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **473**, 879–885.
- Zhang W, Zhang H, Liu K, Jian G, Qi F, Si N.** 2017. Large-scale identification of *Gossypium hirsutum* genes associated with *Verticillium dahliae* by comparative transcriptomic and reverse genetics analysis. *PLOS ONE* **12**, e0181609.
- Zhang W-W, Jiang T-F, Cui X, Qi F-J, Jian G-L.** 2013b. Colonization in cotton plants by a green fluorescent protein labelled strain of *Verticillium dahliae*. *European Journal of Plant Pathology* **135**, 867–876.
- Zhang Y, Wang X, Yang S, Chi J, Zhang G, Ma Z.** 2011. Cloning and characterization of a Verticillium wilt resistance gene from *Gossypium barbadense* and functional analysis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports* **30**, 2085–2096.
- Zhang Y-Y, Fischer M, Colot V, Bossdorf O.** 2013c. Epigenetic variation creates potential for evolution of plant phenotypic plasticity. *New Phytologist* **197**, 314–322.
- Zhang Z, van Esse HP, van Damme M, Fradin EF, Liu C-M, Thomma BPHJ.** 2013d. *Ve1* -mediated resistance against *Verticillium* does not involve a hypersensitive response in Arabidopsis: HR is not required for *Ve1* immunity in Arabidopsis. *Molecular Plant Pathology* **14**, 719–727.
- Zhao B, Ardales EY, Raymundo A, Bai J, Trick HN, Leach JE, Hulbert SH.** 2004. The *avrRxo1* Gene from the Rice Pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* Confers a Nonhost Defense Reaction on Maize with Resistance Gene *Rxo1*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**, 771–779.
- Zhao Y, Mette MF, Reif JC.** 2015. Genomic selection in hybrid breeding. *Plant Breeding* **134**, 1–10.
- Zheng Z, Nonomura T, Appiano M, Pavan S, Matsuda Y, Toyoda H, Wolters A-MA, Visser RGF, Bai Y.** 2013. Loss of Function in *Mlo* Orthologs Reduces Susceptibility of Pepper and Tomato to Powdery Mildew Disease Caused by *Leveillula taurica*. *PLOS ONE* **8**, e70723.

- Zhou T-T, Zhao Y-L, Guo H-S.** 2017. Secretory proteins are delivered to the septin-organized penetration interface during root infection by *Verticillium dahliae* (NJ Talbot, Ed.). *PLOS Pathogens* **13**, e1006275.
- Zhu H-Q, Feng Z-L, Li Z-F, Shi Y-Q, Zhao L-H, Yang J-R.** 2013. Characterization of Two Fungal Isolates from Cotton and Evaluation of their Potential for Biocontrol of Verticillium Wilt of Cotton. *Journal of Phytopathology* **161**, 70–77.
- Zhu X, Qi L, Liu X, Cai S, Xu H, Huang R, Li J, Wei X, Zhang Z.** 2014. The Wheat Ethylene Response Factor Transcription Factor PATHOGEN-INDUCED ERF1 Mediates Host Responses to Both the Necrotrophic Pathogen *Rhizoctonia cerealis* and Freezing Stresses. *PLANT PHYSIOLOGY* **164**, 1499–1514.
- Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, Caniard A, Jones JDG, Boller T, Felix G.** 2006. Perception of the Bacterial PAMP EF-Tu by the Receptor EFR Restricts *Agrobacterium*-Mediated Transformation. *Cell* **125**, 749–760.
- Zuo W, Chao Q, Zhang N, Ye J, Tan G, Li B, Xing Y, Zhang B, Liu H, Fengler KA, Zhao J, Zhao X, Chen Y, Lai J, Yan J, Xu M.** 2014. A maize wall-associated kinase confers quantitative resistance to head smut. *Nature Genetics* **47**, 151–157.